

TARTU ÜLIKOO

LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND

ÖKOLOOGIA JA MAATEADUSTE INSTITUUT

GEOGRAAFIA OSAKOND

Magistritöö keskkonnatehnoloogias

**Süntetiliste hõbeda nanoosakeste mõju kombineeritud  
tehismärgalapuhasti biokile bakterite ja  
antibiootikumiresistentsusgeenide arvukusele**

**Kadri Saare**

Juhendajad: Hiie Nõlvak, PhD (Tartu Ülikool)

Marika Truu, PhD (Tartu Ülikool)

Tartu 2016

## **Süntetiliste hõbeda nanoosakeste mõju kombineeritud tehismärgalapuhasti biokile bakterite ja antibiootikumiresistentsusgeenide arvukusele**

Mikroreainete nagu antibiootikumid ja nanoosakesed kontsentratsioon olmereovees, reoveepuhastites ja looduskeskkonnas kasvab eksponentsiaalselt, kuid nende mõju keskkonnale on vähe uuritud. Antibiootikumijäägid mõjutavad mikroobikooslusi ja põhjustavad antibiootikumiresistentsete bakterite arvukuse kasvu ning hõbeda nanoosakestel on potentsiaali mõjutada nii reoveepuhastuse protsesse kui looduskeskkonda.

Käesoleva töö eesmärk oli uurida madala kontsentratsiooniga (0,1 mg/l) Ag nanoosakeste mõju Nõo kombineeritud tehismärgalapuhasti filtermaterjali mikroobide üldarvukusele, antibiootikumiresistentsusgeenide arvukusele ja osakaalule ning puhastusefektiivsusele. Uuritud kombineeritud tehismärgalapuhasti asus Nõo reoveepuhasti territooriumil ning koosnes kuuest järjestikku paiknevast vertikaalfiltri ja horisontaalfiltri süsteemist, millest kahele lisati Ag nanoosakesi (0,1 mg/l), kahele AgNO<sub>3</sub> (0,1 mg/l) ning kaks mesokosmi olid kontrollsüsteemid.

Antibiootikumiresistentsusgeenide kvantifitseerimisel saadud tulemused osutavad nanoosakeste ja AgNO<sub>3</sub> suhteliselt sarnasele mõjule nii *sulI*, *tetA* kui *blaCTX-M* puhul. Töö tulemusena selgus, et Ag nanoosakesed ning AgNO<sub>3</sub> ei mõjuta tehismärgala puhastusefektiivsust märkimisväärselt ning uuritud süsteem on väiksem antibiootikumiresistentsusgeenide allikas kui aktiivmudapuhasti. Lisaks leiti, et Ag nanoosakesed vähendavad antibiootikumiresistentsusgeenide osakaalu pinnasfiltrite mikroobikoosluses rohkem kui AgNO<sub>3</sub> töötlus.

Märksõnad: *Tehismärgalapuhasti, hõbeda nanoosakesed, reoveepuhastus, antibiootikumiresistentsus*

CERCS: T270 Keskkonnatehnoloogia, reostuskontroll

## **The effect of synthetic silver nanoparticles on abundance of bacteria and antibiotic resistance genes in the biofilm of hybrid constructed wetland**

Despite the exponential growth of the concentrations of micropollutants like antibiotics and nanoparticles in municipal wastewater, sewage treatment plants and in the nature, their exact impact is largely unknown and the research is too scarce.

The residues of antibiotics cause the selection of antibiotic resistant bacteria and have effects on bacterial communities. Silver nanoparticles have potential to affect wastewater treatment processes and natural environment.

The aim of this study was to investigate the impact of synthetic silver nanoparticles on the treatment efficiency, the abundance of bacteria and antibiotic resistance genes in the biofilm of hybrid constructed wetland. The studied Nõo hybrid constructed wetland consisted of six units (6 vertical+6 horizontal subsurface flow filters). Two units received silver nanoparticles (0,1 mg/l), two units AgNO<sub>3</sub> (0,1 mg/l) and two units were control systems.

The results of quantification of the antibiotic resistance genes in system biofilm indicated that the silver nanoparticles and AgNO<sub>3</sub> had a similar impact on abundance of *sul1*, *tetA* and *blaCTX-M* genes in microbial community. The study results also indicated that neither silver nanoparticles nor AgNO<sub>3</sub> affect treatment efficiency significantly and the hybrid constructed wetland system releases less antibiotic resistance genes compared to activated sludge treatment system. It was also revealed that silver nanoparticles reduce the proportion of antibiotic resistance genes in the biofilm of the subsurface flow filter unit more than AgNO<sub>3</sub> treatment.

**Keywords:** *Constructed wetland, synthetic silver nanoparticles, wastewater treatment, antibiotic resistance genes*

**CERCS:** T270 Environmental technology, pollution control.

# Sisukord

Lühendite nimekiri .....	6
Sissejuhatus .....	7
1. Kirjanduse ülevaade .....	8
1.1 Nanoosakesed ja nende kasutamine .....	8
1.1.1. Nanoosakeste keskkonnamõjud .....	8
1.1.2. Nanoosakeste levik keskkonnas .....	10
1.1.2.1. Nanoosakesed looduskeskkonnas .....	10
1.1.2.2. Nanoosakesed reoveepuhastuses .....	10
1.2 Antibiootikumid .....	11
1.2.1. Antibiootikumide funktsioon ja kasutamine .....	12
1.2.2. Antibiootikumid keskkonnas, potentsiaalsed ohud .....	13
1.2.3. Antibiootikumiresistentsus .....	14
1.2.3.1. Antibiootikumiresistentsusmehhanismid ja -resistentsusgeenide levik .....	15
1.2.4. Antibiootikumide ja antibiootikumiresistentsusgeenide levik reovee puhastussüsteemide kaudu .....	16
1.3. Tehismärgalapuhastid.....	17
1.3.1. Tehismärgalapuhastite tüübid .....	18
1.3.1.1. Vabaveelised tehismärgalad .....	18
1.3.1.2. Horisontaalvoolulised pinnasfiltrid .....	19
1.3.1.3. Vertikaalvoolulised pinnasfiltrid .....	19
1.3.1.4. Kombineeritud tehismärgalapuhastid.....	19
2. Materjal ja meetodika.....	21
2.1. Katsesüsteemi kirjeldus.....	21
2.2. Vee ja filtermaterjali proovide kogumine .....	22
2.3. DNA eraldamine .....	23
2.4. Kvantitatiivne polümeraasi ahelreaktsioon ja esmane andmeanalüüs.....	24
2.4.1. qPCR tingimused.....	24
2.4.2. qPCR andmete rühmitamine ja koopiaarvude leidmine.....	26
3. Tulemused .....	28
3.1. Reovee keemiliste näitajate muut filtersüsteemides.....	28
3.2. Uuritud geenide arvukused filtermaterjali proovides .....	30

3.2.1. Bakterite 16S rRNA geeni arvukus .....	30
3.2.2. ARG-de arvukused .....	31
3.3. ARG-de proportsioonid filtermaterjali bakterikoosluses .....	32
3.4. Seos katseperioodil toimunud filtermaterjali ja filtrist väljavoolavas vees toimunud geenide arvukuste muutuste vahel.....	35
4. Arutelu ja järeldused .....	37
Kokkuvõte .....	41
Summary .....	43
Tänuavaldused.....	45
Kasutatud kirjandus .....	46

## Lühendite nimekiri

AB - antibiootikumid

NO - nanoosakesed

RHÜ - reaktiivsed hapnikuühendid

KA - kuivaine

NH<sub>4</sub>-N- ammoniumlämmastik

NO<sub>3</sub>-N - nitraatlämmastik

ÜldN - üldlämmastik

ÜldP - üldfosfor

PO<sub>4</sub>-P - fosfaatfosfor

ÜldC - üldsüsinik

AR - antibiootikumiresistentsus

ARG - antibiootikuresistentsusgeen

ARB - antibiootikumiresistentne bakter

VRE - vankomütsiini-resistentne enterokokk

MRSA - metitsilliiniresistentne *Staphylococcus aureus*

VF - vertikaalvooluline pinnasfilter

HF - horisontaalvooluline pinnasfilter

SH - standardhälve

qPCR - kvantitatiivne polümeraasi ahelreaktsioon

KV - katsevariant

OS - osasüsteem

## Sissejuhatus

Antibiootikumid on ühed edukamad ja enimkasutatud ravimid nii meditsiinis kui veterinaarias ning lisaks on neil muidki põllumajanduslikke rakendusi (Kemper 2008).

Kuigi antibiootikume on suures koguses kasutatud juba aastakümneid, on nende mõju keskkonnale pälvinud võrdlemisi vähe tähelepanu. Inimasulatest ja farmidest pärinevad jäätmed võivad sisaldada antibiootikume ja antibiootikumiresistentsusgeene, mis ohustavad looduslikku keskkonda. Antibiootikumide kasutamine mõjutab lisaks sihtmärkorganismidele ka muid keskkonnas olevaid mikroobe ning põhjustab selektsiooni tagajärjel resistentsete mikroobide arvukuse kasvu looduses, muudab keskkonna mikroobikooslust ning mõjutab nende organismide elutegevust (Kemper 2008; Martinez 2009).

Nanotoodete hulga kiire (eksponentsiaalse) kasvuga seoses kasvab aasta-aastalt ka sünteetiliste nanoosakeste kontsentratsioon keskkonnas (Musee *et al.* 2011). Kuna nanohõbedat sisaldavaid tooteid kasutatakse kõige enam, leidub hõbeda nanoosakesi ka keskkonnas proportsionaalselt kõige rohkem (Sheng & Liu 2011). Uuringud on näidanud, et nanoosakesed võivad mõjutada reoveepuhastusprotsesse, mulda, setetes ja vette sattudes ise reoaineteks muutuda ning lõpuks taimedesse ja toiduahela kaudu ka loomadesse sattuda (Brar *et al.* 2010).

Nii antibiootikumide kui sünteetiliste nanoosakeste keskkonnariskidest ja üldisest mõjust vee- ja mulla mikroobikooslusele on üsna vähe teada. Alles viimasel kümnendil on kasvanud põhjalikumate uuringute hulk, mis hõlmab antibiootikumide ning neile resistentsete organismide esinemist, levikut ja mõju (Martinez *et al.* 2009; Knapp *et al.* 2010; Allen *et al.* 2010; Cytryn 2013; Jechalke *et al.* 2014). Rohkem on uuritud antibiootikumide kasutamist põllumajanduses ja infektsioonide ravis ning nende mõju inimese tervisele (Caracciolo *et al.* 2015; Martinez 2009). Kuna sünteetilisi nanoosakesi on kasutatud veelgi lühemat aega, on ka neile keskenduvaid uuringuid vähem. Reoveepuhastuse seisukohast on pigem uuritud üksikute nanoosakeste esinemist ja mõju (Sheng *et al.* 2011; Zheng *et al.* 2011; Kaegi *et al.* 2013, Ma *et al.* 2014).

Käesoleva magistritöö eesmärk oli hinnata sünteetiliste hõbeda nanoosakeste mõju kombineeritud tehismärgalapuhasti vertikaal- ja horisontaalfiltri biokile bakterite ja kolme antibiootikumiresistentsusgeeni (*sulI*, *tetA* ja *blaCTX-M*) arvukusele ning süsteemi veepuhastusvõimele.

# 1. Kirjanduse ülevaade

## 1.1 Nanoosakesed ja nende kasutamine

Nanotehnoloogia on kiiresti arenev tööstusvaldkond, mis mõjutab paljusid majandussektoreid ning loob ja väljastab pidevalt uute kasutusvõimalustega nanoosakesi sisaldavaid tooteid. Nanoosakesed (NO) erinevad nõ tava suuruses aineosakestest eelkõige suurema eripinna ning sellest põhjustatud parema reaktiivsuse ja sidumisvõime, aga ka optiliste omaduste poolest (Vale *et al.* 2016; Brar *et al.* 2010). Enamlevinud alusmaterjalid sünteetiliste NO-te tootmiseks on süsinik, millest tehakse näiteks nanotorusid ja fullereeni, või metallid (näiteks Ag, Zn, Ti); kasutusel on ka binaarseid ühendeid (nt  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{ZnO}$ ) ja saviosakesi (Musee *et al.* 2011).

2014. aastal tarbiti maailmas 225 060 tonni NO-si (Vale *et al.* 2016). Neid kasutatakse meditsiinis (nt kannavad NO-d organismi ravimeid, on vähkkasvaja pildi kujutamisel kontrastained), elektroonikaseadmetes (nt kattematerjalid patareides ja elektroodidel, väiksemad komponendid nutitelefonides, odavamad ja erksamad ekraanid), arvutites (nt kiibid), kosmeetikatoodetes (nt  $\text{TiO}_2$  ja  $\text{ZnO}$  põhised UV-filtrid päikesekreemides, kauapüsiva efekti ja erksamate värvide tagamine), riideesemetes, värvides (mikroobidevastased või vett-tõrjuvad omadused, kaitse kriimustuste eest) ning ka pinnase remediatsioonis (nt pestitsiidide, PAH-ide eemaldamisel) ja joogivee puhastusel (Brar *et al.* 2010; Farré *et al.* 2009; Kaisera *et al.* 2013; Murthy 2007; Raj *et al.* 2012; Schaumann *et al.* 2015; Vale *et al.* 2016).

Kõige enam kasutatakse sünteetilisi hõbeda nanoosakesi sisaldavaid materjale. Antimikroobsete omaduste tõttu on Ag-NO-d paljudes laiatarbekaupades nagu kehahooldustooted, toidumahutid, pesuvahendid, riideesemed (nt hõbeniidiga sokid), värvid ning kodumasinad (biokile tekke vältimiseks nt pesumasinates). Lisaks on Ag-NO-d kasutusel reoveepuhastuses, ravimite ning geeniülekandesüsteemides, haavaravis, luuproteesides ja biosensorites. (Sheng & Liu 2011; Yang *et al.* 2013)

### 1.1.1. Nanoosakeste keskkonnamõjud

Erinevalt mitmetest teistest innovaatilistest materjalidest hakati NO-te potentsiaalset keskkonnamõju uurima enne, kui tulid esimesed teated negatiivsetest mõjudest (Schaumann *et al.* 2015). Oma füüsikalise-keemiliste omaduste tõttu erinevad NO-te levik ja käitumine



keskkonnas ning toksikoloogiline efekt bioloogilistele süsteemidele oluliselt n-ö tava suuruses materjalide vastavatest omadustest (Musee *et al.* 2011; Vale *et al.* 2016).

Mitmeid NO-si kasutatakse nende antibakteriaalsete omaduste tõttu, kuid erinevatesse keskkondadesse sattudes võivad need mõjutada ka mikroobipopulatsioone, mis viivad läbi olulisi aineringe protsesse nagu orgaanilise aine lagundamine, keemiliste elementide muundamine ning toitainete (taas)kasutamine (Musee *et al.* 2011). Põhiline NO-te kasutamisega seotud toksikoloogiline probleem on see, et mõningad NO-d (nt nano-Ag, nano-TiO<sub>2</sub> ja fullereenid) on redoksaktiivsed (Farré *et al.* 2009), neid on võimalik transportida läbi mikroorganismide rakumembraani, sealhulgas ka mitokondritesse (Brar *et al.* 2010), ning need mõjutavad reaktiivsete hapnikuühendite (RHÜ) tekke tõttu membraanide läbilaskvust (Brar *et al.* 2010; Musee *et al.* 2011). Membraani oksüdeerivad RHÜ võivad mõjutada ka energia muundamise radu, oksüdeerides näiteks membraani komponente, mis on seotud energiarajaga, või häirivad RHÜ membraaniga seotud elektronikandjaid. Lisaks võivad RHÜ mõjutada valkude terviklikkust ja nende sünteesi mikroobirakus. Kaitseks NO-te mõju eest võivad mikroobid toota ekstratsellulaarseid polümeere (Brar *et al.* 2011). (Vale *et al.* 2016).

Lisaks mikroobidele mõjuvad NO-d ka kõrgematele organismidele, kelle puhul on mõju pigem mutageenne kui otseselt letaalne. RHÜ põhjustatud oksüdatiivse stressi tulemusena võib tekkida tsüto- või genotoksilisus ning sealjuures on NO-te interaktsioon organismidega NO-spetsiifiline. Näiteks mõjutavad nano-TiO<sub>2</sub> ja nano-Ag sarnaselt organismis valgusünteesi ja ööpäevarütmi regulatsiooni; nano-ZnO ja nano-CuO mõjud on enamasti seotud oksüdatiivse stressiga. Biokeemilised vastused RHÜ-le on seotud geeniekspressiooni ja antioksidantsete ensüümide nagu katalaas ja superoksiidi dismutaas tootmise regulatsiooniga. (Vale *et al.* 2016)

Uuringud näitavad, et süsiniku nanotorukeste sissehingamine võib hiirtel põhjustada pahaloomulisi kasvajaid, põletikku ning pikema aja jooksul ka kopsukudede kärbumist (Lam *et al.* 2004). Kaladel põhjustas kokkupuude süsiniknanotorude ja C<sub>60</sub>ga oksüdatiivset stressi (Brar *et al.* 2010). Inimeste puhul on täheldatud sissehingataivate ultrananoosakeste (diameeter väiksem kui 100 nm) mõju kopsudele (võivad põhjustada kopsupõletikku) samuti on näidatud, et päikesekreemides sisalduv nano-TiO<sub>2</sub> võib läbida inimese nahka vigastatud kohtades (Brayne 2008, Brar *et al.* 2010).

## **1.1.2. Nanoosakeste levik keskkonnas**

### **1.1.2.1. Nanoosakesed looduskeskkonnas**

NO-d jõuavad vee- ja maismaaökosüsteemidesse otsese kasutuse tõttu (nt NO-si sisaldavad paadivärvid), õhu kaudu, reoveepuhastite heitvee ja väetisena kasutatava reoveesetega. Looduses satuvad NO-d dünaamiliste füüsikalise-keemiliste omadustega keskkonda, mille tulemusena võivad NO-te omadused võrreldes algomadustega ennustamatult muutuda (Vale *et al.* 2016).

Tööstuslikult toodetud NO-te transformatsioonide uurimine välitingimustes on keeruline tänu looduslikele NO-tele (nt osakesed vulkaanipursetest, liivatormidest, metsatulekahjustest, soolakristallid ookeanide veeaurust), mis sarnanevad oma molekulaarstruktuurilt ja suuruselt tööstuslikult toodetud NO-tega (Buzea *et al.* 2007). NO-d võivad jääda pikaks ajaks keskkonda ning selle elustikule potentsiaalselt ohtlikud olla, kuna interakteeruvad veepindade ja elusorganismidega ning moodustavad agregate, mis võivad näiteks ummistada rakumembraane. Mikroobide puhul seisneb oht otseses toksilisuses ning oksüdatiivse stressi tekkes (Ivask *et al.* 2014a) ning lisaks võivad NO-d toiduahelas kuhjuda nii, nagu on näidatud nano-Ag puhul kalades (Brar *et al.* 2010).

NO-te biosaadavust ning seega ka biodegradatsiooni vesikeskkonnas mõjutavad nende ainete lahustuvus ja dispergeeritavus, osakeste suurus, nanomaterjalide interaktsioon vees leiduvate kemikaalidega ning bioloogilised ja abiootilised protsessid nagu fotoreaktsioonid (Brar *et al.* 2010, Ivask *et al.* 2014b). Vette sattunud NO-d settivad enamasti aeglasemalt kui suured osakesed, kuid suure eripinna tõttu on NO-tel potentsiaal seonduda mulla ja setetega, mille tõttu on neid lihtsam veest eemaldada (Brar *et al.* 2010). Pinnasesse ning setetesse jõudnud NO-te saatus oleneb konkreetsete NO-te füüsikalise-keemilistest omadustest (sh lahustuvus või kolloidne stabiilsus). NO-d võivad olla pinnase või setetega tugevalt seotud ja seega immobiilsed. Teisalt võivad väiksemad NO-d mahtuda mullaosakeste vahele ning nõnda kaugemale levida (Brar *et al.* 2010). NO-d interakteeruvad mulla ja pinnavee mikroobidega nii passiivsete mehhanismide (näiteks membraani läbimine, mille tulemuseks on membraani deformatsioon) kui ka aktiivsete mehhanismide vahendusel (endotsütoos) (Shang *et al.* 2014).

### **1.1.2.2. Nanoosakesed reoveepuhastuses**

Erinevatest kasutusvaldkondadest jõuavad NO-d varem või hiljem tööstus- ja olmereovette ning lõpuks ka reoveepuhastitesse ning jääkmudasse. Reoveepuhastites toimuvad NO-tega mitmed muutused nagu kolloidide moodustumine ja erinevad keemilised reaktsioonid. NO-te

kolloidne stabiilsus mõjutab nii nende biosaadavust puhastussüsteemis kui ka antibakteriaalsete NO-te potentsiaalset toimet reoveepuhastusprotsesse läbiviivatele aktiivmuda mikroobidele (Schaumann *et al.* 2015). Üldiselt oleneb NO-te stabiilsus ja mõju vesikeskkonnas osakese suurusest, kujust, eripinnast, pinnalaengust ja agregatsioonist, aga ka nende valmistamisviisist või -tingimustest. Lisaks on olulised NO-te võime moodustada kolloidsüsteeme, adsorbeeruda pindadele (sh elusorganismide välispindadele) ning abiootilised tegurid nagu reovee pH, soolsus, karedus, orgaanilise aine ja muude reovees olevate kemikaalide sisaldus (Brar *et al.* 2010; Musee *et al.* 2011).

Reoveepuhasti bakterikooslust mõjutades häirub puhastites ka tavaliste reoainete nagu anorgaaniliste ühendite, metallide ja orgaanilise aine eemaldamine, mis viib kogu süsteemi reovee puhastusefektiivsuse vähenemiseni (Musee *et al.* 2011). Lisaks võivad NO-d reoveepuhastusprotsesse mehaaniliselt häirida, kinnitudes torudele ja muudele pindadele, kust neid on keeruline eemaldada. Näiteks adsorbeeruvad süsinikupõhised nanomaterjalid nagu fullereen reoveepuhastuses kasutatavatele materjalidele. Samas on fullereenidel võime siduda orgaanilisi reoaineid nagu naftaleen ning kui selliseid NO-naftaleen-komplekse reoveepuhastuses ei eemaldata, jõuab naftaleen heitveega loodusesse (Brar *et al.* 2010).

Kuna NO-d on iseseisvalt settimiseks enamasti liiga väikesed, on nende eemaldamine tõenäolisem reoveepuhastuse lõppetappides. Protsessi efektiivsus oleneb konkreetse NO füüsikalise-keemilistest omadustest, reovee omadustest ja viibest puhastussüsteemis. Näiteks mõjutab keskkonna pH NO aglomeratsiooni, sorptsiooni ja liikumist (Brar *et al.* 2010). NO-te eemaldust reoveest soodustab koagulantide ja flokulantide lisamine, NO-te omavaheliste agregaatide teke, orgaaniliste saasteainetega sidumine või adsorptsioon selektiivsele pinnale. Teatud hulk NO-si jõuab siiski reoveepuhastusest edasi looduslikesse veekogudesse (Brar *et al.* 2010).

## 1.2 Antibiootikumid

Antibiootikumid (AB) on looduslikud, poolsünteetilised või sünteetilised kemoterapeutilised ained, millel on mikroorganismidele (bakterid, seened, algloomad, viirused) olenevalt kogusest kasvu pärssiv või letaalne mõju (Kemper 2008; Kümmerer 2009).

Kuna AB-d on algselt looduslikku päritolu, siis leidub neid ka inimõjuta keskkondades. Näiteks mullas leidub palju AB-de sünteesijaid, millest tuntuimad on aktinomütseedid nagu

*Streptomyces*, kes toodavad streptomütsiini. Lisaks toodavad mullabakterid näiteks  $\beta$ -laktaame, streptomütsiini, aminoglükosiide jpm (Kümmerer 2009). Seetõttu on AB-de riskianalüüsil oluline arvestada nende looduslikku taustkontsentratsiooni.

Esimesena avastati (1928. aastal) *Penicillium*-i perekonda kuuluva seene poolt toodetav penitsilliin (Kohanski *et al.* 2009). Avastusele järgnes üsna pea AB-de laialdane kasutuselevõtt bakteriaalsete haiguste ravis. Praeguseks on olemas sadu erinevaid AB-e, mida toodetakse keemilise sünteesi või looduslike ühendite modifitseerimise teel (Kümmerer 2009). AB-d on mitmekesine rühm kemikaale, mida enamasti grupeeritakse toimetehhanismide (nt nukleiinhapete, rakukesta või valgusünteesi pärssimine) või keemilise koostise järgi. Keemilise struktuuri järgi jagunevad AB-d umbes kümnesse klassi, mille hulgas on näiteks  $\beta$ -laktaamid (nt penitsilliin), aminoglükosiidid, kinoloonid, tetratsükliinid, sulfoonamiidid, makroliidid jm (Kemper 2008; Kümmerer 2009).

AB-de lagundamist keskkonnas mõjutavad nii ühendi enda kui ka ümbritseva keskkonna omadused nagu mulla koostis, ilmastikutingimused ja mulla mikroobikoosus (Kemper 2008; Kümmerer 2009). Näiteks võib keskkonna pH muuta AB-de sorptsiooniomadusi, fotoreaktiivsust, antibiootilist aktiivsust ja toksilisust. Lisaks on AB-de lagundatavus aeglasem talvel madala temperatuuriga (Li *et al.* 2014). Peamised looduslikud AB-de lagunemisprotsessid on fotodegradatsioon, keemiline lagunemine ja biolagundamine. Neid protsesse võib takistada AB adsorptsioon pinnaseosakestele (Li *et al.* 2014).

### **1.2.1. Antibiootikumide funktsioon ja kasutamine**

AB-de eesmärk looduses on pidurdada konkureerivate mikroobide kasvu ja anda seega eelis AB-i tootvale organismile, mis mõjutab ka looduslikku valikut ja uute mikroobide arengut. AB-d pärssivad mikroobide elutähtsaid protsesse nagu rakukesta, DNA ja valkude süntees ning rakumembraanide töö (Kohanski *et al.* 2009). Lisaks mõjutavad AB-d juba madalas kontsentratsioonis mikroobide metaboolset aktiivsust (transkriptsiooni protsessi kaudu) ning toimivad signaalmolekulidena (Martinez 2009).

Meditisiinis kasutatakse AB-e eesmärgiga ennetada või ravida bakteriaalseid infektsioone. Samal eesmärgil kasutatakse AB-e veel loomakasvatustes, veterinaarmeditsiinis, mesilaste kasvatamisel ja näiteks vesiviljeluses, kus antimikroobseid aineid lisatakse otse vette, mille tagajärg on AB-de kõrge kontsentratsioon nii vees kui sellega kokku puutuvates setetes ja

pinnases (Martinez 2009). Lisaks kasutatakse AB-e ka taimekahjurite tõrjeks (Kümmerer 2009). AB-de kasulikkus seisneb tootlikkuse suurenemises nii taime- kui loomakasvatustes ning ka liha kvaliteedi parandamises.

Mõningates riikides on AB-de kasutamine piiratud (nt Saksamaal puuviljade kasvatamisel). Inimestele mõeldud AB-de kasutamine kariloomadel keelati Euroopa Liidus 1998. aastal (Martinez 2009). AB-de kasutamine toidulisandina loomade kasvu soodustamiseks keelati Euroopa Liidus täielikult 2006. aastal (Kemper 2008), kuid USA-s on see endiselt lubatud (Paulson & Zaoutis 2015).

2010. aastal tarbiti AB-e maailmas hinnanguliselt üle 73 miljardi üksikdoosi (Van Boeckel *et al.* 2014). Põllumajanduses kasutati 2010. aastal AB-e rohkem kui 63 100 tonni (Van Boeckel *et al.* 2015). Euroopa Liidu elanikkonna kaalutud keskmine AB-kasutus kodustes tingimustes oli 21,6 üksikdoosi 1000 inimese kohta päevas. Kliinilises keskkonnas oli kaalutud keskmine AB-kasutus 2,1 üksikdoosi 1000 inimese kohta päevas (ECDC 2015).

### **1.2.2. Antibiootikumid keskkonnas, potentsiaalsed ohud**

Looduslik AB-de taustkontsentratsioon on madal ning sellest kõrgem AB-i kontsentratsioon keskkonnas (AB-reostus) on inimtekkeline. Inimesed ja loomad suudavad kasutatud AB-dest omastada vaid mingi osa. Kümmerer & Henninger (2003) andmetel väljutatakse keskmiselt 70% tarbitud AB-dest muutumatul kujul ning hiljem jõuavad AB-jäägid või nende metaboliidid reovette. Reoveepuhastites eemaldatakse AB-d vaid osaliselt ning seetõttu jõuavad need puhastite väljavoolu kaudu looduslikku vesikeskkonda. Edasi võivad AB-de jääkkogused jõuda nii pinnavette, põhjavette kui ka pinnasesse (Caracciolo *et al.* 2014).

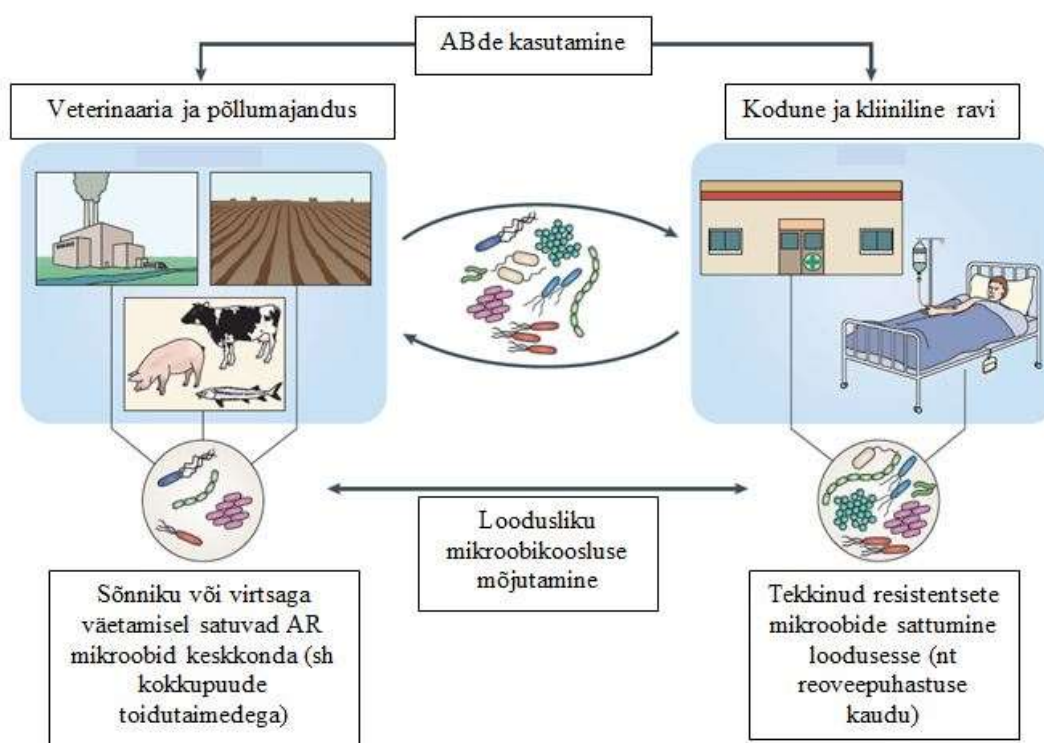
Põllumajanduses kasutatavaid AB-e leidub kõige enam sõnnikus või virtsas, mille puhul seisneb oht looduskeskkonnale nende kasutamises väetisena. Lisaks võib AB-e loodusesse sattuda otse linnulihatööstuse ja liha käitlemise reoveest, vesiviljelusest ning ka ravimitööstusest (Kümmerer 2009).

Looduskeskkonnas on AB-del potentsiaali mõjutada nii vee kui maismaa organisme ning lõpuks jõuda joogivee ja köögiviljade kaudu ka tagasi inimeseni. Lisaks soovitud efektile võib AB-de tarbimisel olla mitmeid kõrvalmõjusid. Näiteks võib penitsilliin inimestel põhjustada allergilist reaktsiooni, kinoloonide tarbimisel võib suurenedada silmade

valgustundlikkus ja tetratsükliinid võivad negatiivselt mõjutada nii seedetrakti mikrofloorat kui ka väikelaste hammaste arengut (Kümmerer 2009).

### 1.2.3. Antibiootikumiresistentsus

Nagu AB-d, on ka antibiootikumiresistentsus (AR) looduslik nähtus (näiteks *Pseudomonas aeruginosa* on penitsilliin G-le resistentne [Kümmerer 2009]) ning antibiootikumiresistentsusgeene (ARG) on leitud ka sellistest keskkondadest nagu sügavalt maapõuest (Brown & Balkwill 2009), Antarktika veeproovidest (De Souza *et al.* 2006) ning Gröönimaa jääst (Miteva *et al.* 2004), mis pole tõenäoliselt AB-saastega kokku puutunud. Põllumajandusest ja meditsiinist pärit AB-saaste, AB-resistentsete mikroobide loodusliku selektsiooni ja uute resistentsete mutantide tekke tõttu on kasvanud resistentsete organismide osakaal looduskeskkonnas (joonis 1, Martinez 2009).



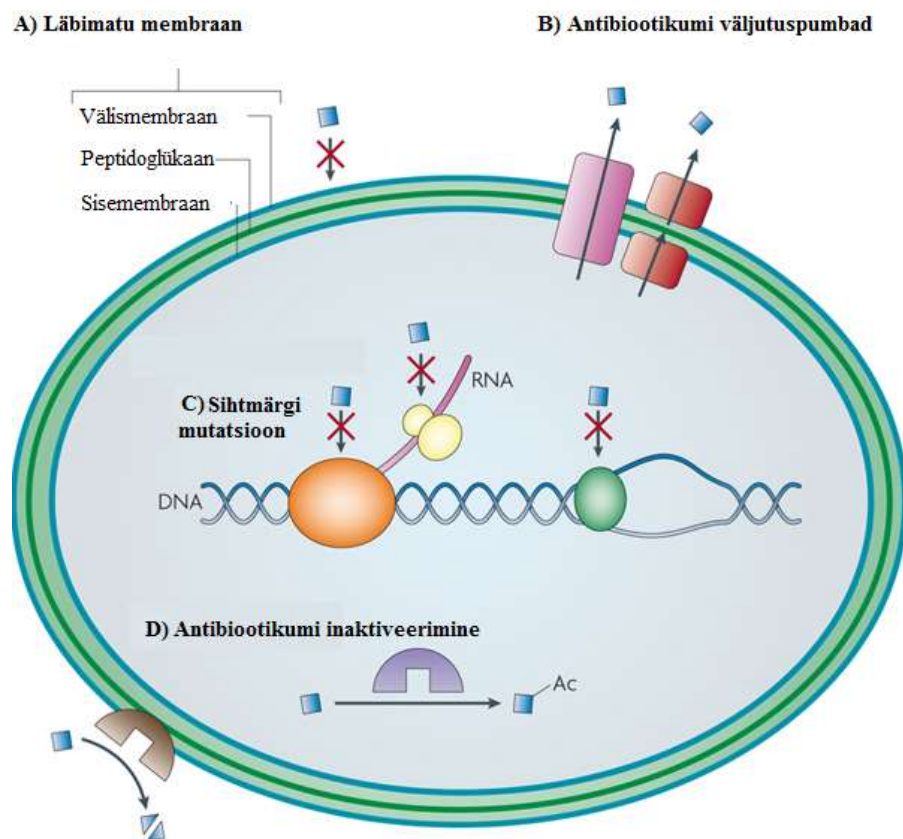
**Joonis 1.** Antibiootikumiresistentsuse teke ja levik (Berendonk *et al.* 2015 põhjal)

AB-resistentsuse levik patogeensete bakterite hulgas piirab ravivõimalusi, suurendab nakkushaigustesse haigestumust ja suremust ning AB-dega seotud kõrvaltoimeid (Zhang *et al.* 2009). Tuntumad meditsiinilised näited on vankomütsiini-resistentne enterokokk (VRE), metitsilliiniresistentne *Staphylococcus aureus* (MRSA) ning multiresistentne *Pseudomonas*

*aeruginosa* (Knapp 2010). Resistentsete mikroobidega nakatumise puhul on diagnoos ning ravi keeruline ja kulukas. Uute molekulaarbioloogiliste meetodite rakendamine uuringutes võimaldab kiirelt tuvastada uued antibiootikumiresistentsed geenimutatsioonid populatsioonides ja jälgida AR mikroobide teket ja arengut (Sharma *et al.* 2016).

### 1.2.3.1. Antibiootikumiresistentsusmehhanismid ja -resistentsusgeenide levik

Mikroobidel on välja kujunenud mitmeid mehhanisme kaitseks antimikroobsete ainete vastu (joonis 2). Peamised resistentsusmehhanismid on AB-dele läbimatu rakumembraan (nt poriinigeenide ekspressiooni mahasurumise abil), AB väljutuspumbad, AB sihtmärgi modifitseerimine, AB-de ensümaatiline lagundamine (nt beetalaktamaasi abil) või deaktiveerimine (Tenover *et al.* 2006; Sharma *et al.* 2016).



**Joonis 2.** Antibiootikumiresistentsuse mehhanismid Gram-negatiivsel bakterirakul: A) läbimatud membraanid: osad antibiootikumid ei suuda läbida gram-negatiivse raku membraane; B) antibiootikumi väljutuspumbad: rakku sisenenud antibiootikum pumbatakse tagasi väliskeskkonda; C) sihtmärgi muteerumine: joonisel on näitena muteerunud DNA güraas (roheline); D) antibiootikumi inaktiveerimine lagundades või modifitseerides. Antibiootikum on joonisel kujutatud sinise ruuduna (Allen *et al.* 2010 põhjal).

AB-resistentsus võib tekkida nii looduses kui inimõjuga keskkondades loodusliku valiku ja spontaansete kromosoommutatsioonide tõttu (vertikaalne geenitriiv). Lisaks on olemas horisontaalne geenitriiv, kus mikroobid omandavad konjugatsiooni, transformatsiooni või transduktsiooni vahendusel vabalt keskkonnas oleva DNA, bakteriofaagi või naaberraku DNA ning selle hulgas ka ARG-e (Tenover *et al.* 2006; Sharma *et al.* 2016).

AB-resistentsus levib valdavalt sama bakteriliigi siseselt, kuid on võimalik ka levik erinevate liikide vahel peamiselt mobiilsete geneetiliste elementide abil (nt plasmiidid, transposoonid, integronid ja geenikassetid) (Kemper 2008). Mõned horisontaalse geenitriivi elementidest (nt transposoonid) kannavad üle mitut resistentsusgeeni korraga (Tenover *et al.* 2006; Sharma *et al.* 2016). Seetõttu on osad bakterid (nt *Staphylococcus aureus* (MRSA)) muutunud multiresistentseks (resistentsus rohkem kui 3 AB-klassi suhtes) ja on ühtlasi mureallikaks haiglates ning muudes terviseasutustes, kus neid kohtab kõige sagedamini (Tenover *et al.* 2006). Ehkki AB-resistentse fenotüübi omandamine on enamasti energeetiliselt ebasoodne, võib see bakteri ainevahetuses põhjustada muutusi, mis võivad mõningates kasvukohtades kasuks tulla (Martinez 2009).

Mikroobid võivad AB-e sisaldavas keskkonnas ellu jääda ka geneetilise mutatsioonita. Kui mingi hulk populatsioonist elab üle tavaliselt letaalse AB kontsentratsiooni, nimetatakse nähtust kollektiivseks AB-tolerantsuseks (Meredith *et al.* 2015).

#### **1.2.4. Antibiootikumide ja antibiootikumiresistentsusgeenide levik reovee puhastussüsteemide kaudu**

Enamus AB-e on vesilahustuvad ning reo-, pinna- ning põhjaveest on leitud üle 30 erineva antibiootikumi jälgi (Kemper 2008). Kuna reoveepuhasti ühendab omavahel erinevaid keskkonnaelemente nagu olmereovesi ja pinnavesi, võib sellise süsteemi kaudu toimuda ka nende keskkondade vaheline AB-de, ARG-de ja antibiootikumiresistentsete bakterite (ARB) levik (Zhang *et al.* 2009). Uuringud on näidanud, et AB-del on potentsiaali mõjutada ka reoveepuhasti mikrobikooslust ning selle kaudu mõjutada orgaanilise aine lagundamist puhastis (Kümmerer 2009). Lisaks võib suur mikroobide arvukus, biokile liigiline mitmekesisus ja aktiivmuda reoveepuhastis soodustada mikroobidevahelist geenivahetust, kuna kõrge bakterite arvukusega keskkonnad soodustavad geeniülekanget ja ARG-de kombinatsioonide teket (Kümmerer 2009; Zhang *et al.* 2009). Ka on reoveepuhastist leitud



palju antibiootikumijääke, raskmetalle, nanoosakesi jm aineid, mis võivad soodustada ARB-de selektsiooni (Zhang *et al.* 2009).

Reoveepuhastis eemaldatakse AB-d vaid osaliselt ning seetõttu jõuavad need heitvee kaudu looduslikku vesikeskkonda. Samuti satuvad vette ARB-d ja ARG-d, mis võivad levida keskkonna mikroobioomis ning suurendada resistentsete organismide arvukust. Lisaks soodustab AB-de pidev madal kontsentratsioon keskkonnas ARB osakaalu suurenemist koosluses (Cytryn 2013; Kümmerer 2009 (2); Martinez 2009; Zhang *et al.* 2009).

### 1.3. Tehismärgalapuhastid

Reoveepuhastuse käigus eemaldatakse veest soovimatud reoained ja organismid, kasutades nii mehaanilisi, füüsikalisi, keemilisi kui ka bioloogilisi puhastusmeetodeid. Bioloogilise puhastuse jaoks on tavaliselt kasutusel aktiivmudapuhastid, kuid kasutatakse ka alternatiivseid süsteeme nagu tehismärgalapuhastid.

Tehismärgalad on inimese poolt rajatud kontrollitava keskkonnaga süsteemid, mis on ehitatud looduslike märgalade tingimusi imiteerides, kasutamaks ära märgaladele tüüpilisi füüsikalisi ja biokeemilisi protsesse saasteainete hulga vähendamiseks reoveest (Fonder & Headley 2013; Vymazal 2011). Esimesed katsed kasutada märgalade taimi veepuhastuseks toimusid 1950ndatel aastatel Saksamaal ning 1960. aastate lõpuks pandi tööle juba esimesed täismahus tehismärgala-veepuhastussüsteemid (Vymazal 2011). Viimase paarikümne aastaga on tehismärgalapuhastite tehnoloogia laialt levinud ja tehismärgalapuhastid kuuluvad nüüdseks usaldusväärsete veepuhastustehnoloogiate hulka, võimaldades erinevatest allikatest pärit reovee (lisaks olmereoveele ka linnade sadevee, tööstusliku ning põllumajandusest pärineva reovee, kaevandusvee ja prügilate nõrgvee) puhastust (Kadlec & Wallace 2009).

Paralleelselt tehismärgalapuhastite kasutamisega on arenenud ka teadmised saasteainete ärastusmehhanismidest neis süsteemides. See on omakorda võimaldanud luua eriotstarbelisi veepuhastussüsteeme, näiteks mingi spetsiifilise reoaine (nt raskmetallid) või kindlast allikast (nt kaevandusvesi, raskmetallidega saastunud vesi jpm) pärit reovee puhastamiseks (Faulwetter *et al.* 2009). Tehismärgalapuhastite arengu algusjärgus keskendusid uuringud käitlusviisidele nagu sadestumine, filtratsioon, adsorptsioon ning saasteainete taimedesse sidumine. Mitmed uurimused on näidanud, et erinevat tüüpi tehismärgalad võimaldavad reovee puhastamiseks rakendada ka väga erinevaid mikroobseid protsesse (Truu *et al.* 2009).

Tehismärgalapuhastite eelised on esteetiline välimus, madalad rajamis- ja hoolduskulud, elupaikade teke looduslike märgalade taimedele ja loomadele (vabaveelised süsteemid), stabiilne töövõime ka kõikuva veetaseme ja reoainete hulga ning suurte veehulkade korral (nt linnade sadevesi) ning efektiivne lämmastiku, orgaanilise aine ja heljumi ärastus. Lisaks on tehismärgalapuhastid sobivad hajaasustusega piirkondadesse, kus väikese reostuskoormuse tõttu ei ole muud tüüpi puhastid majanduslikult tulusad (Lee *et al.*, 2009; Kadlec & Wallace 2009). Puudusteks on mõnede tehismärgalapuhastite tüüpide kinnikülmumine külmas kliimas talvisel perioodil ja seega puhastusefektiivsuse ajutine langus (Kadlec & Wallace 2009), aktiivmudapuhastitega võrreldes väiksem fosfori ärastuse efektiivsus (Vymazal 2010) ning vajadus fosforiga küllastumise tõttu filtermaterjal teatud aja tagant välja vahetada (Pedescoll *et al.*, 2009). Lisaks vajavad tehismärgalapuhastid enamasti suurt pindala, mis ei ole tiheasustusega piirkondades paraku võimalik.

### **1.3.1. Tehismärgalapuhastite tüübid**

Tehismärgalapuhastid jagunevad veetaseme järgi märgalas vabaveelisteks ja pinnasfiltriteks. Pinnasfiltrid omakorda jagunevad vee voolusuuna järgi horisontaal- ja vertikaalvoolisteks filtriteks.

#### **1.3.1.1. Vabaveelised tehismärgalad**

Vabaveelistes tehismärgalades on veetase pinnasest keskmiselt 0,4 m kõrgemal ja veevoolu kiirus on mõõdukas (Fonder & Headley 2013). Enamasti on need märgalad taimestatud nii põhja kinnituvate kui ujuvate veetaimedega (näiteks laialehine hundinui *Typha latifolia*, harilik pilliroog *Phragmites australis*, harilik luga *Juncus effusus*, kollane võhumõök *Iris pseudacorus* [Faulwetter *et al.* 2009]). Loodusliku ilme tõttu meelitab vabaveeline tehismärgala ka erinevaid putukaid, kahepaikseid, linde ning imetajaid (Kadlec & Wallace 2009). Vabaveelisi tehismärgalapuhasteid on kasutatud näiteks olmereovee ja kaevandusvee puhastamiseks (Vymazal 2011). Teoreetiliselt on neid võimalik kasutada kõigis kliimavöötmes, kuid põhja pool võib puhasti pind talvisel ajal jäätuda, mis võib aeglustada mikroobide elutegevust ja seega pärssida mõningaid puhastusprotsesse nagu näiteks lämmastikuärastus (Vymazal 2011).

### **1.3.1.2. Horisontaalvoolulised pinnasfiltrid**

Horisontaalvoolulised pinnasfiltrid on veega küllastunud, veetase asub 10 cm allpool filtri pinda ja puhastusprotsessid toimuvad poorses filtris, mille materjaliks võivad olla purustatud kivid, kruus, liiv, tuhk (Kasak *et al.*, 2015), kergkruus (Vymazal 2010) ja mitmed teised materjalid. Kui on tegemist taimestatud filtritega, siis toimuvad aktiivsed puhastusprotsessid ka taimede risosfääris. Reovesi juhitakse filtrisse katematerjali all olevast sissevooluavast, puhastatav vesi läbib horisontaalselt voolates aeglaselt filtri ning väljub väljavooluavast filtri teises otsas. Veega küllastuse tõttu on enamus filtrist anaeroobne või anoksiline (sobides seega denitrifikatsiooniprotsessiks), kuid taimestatud filtrite puhul on taimede risosfääris ja selle ümbruses ka aeroobseid tsoone (Fonder & Headley 2013; Vymazal 2011).

Enamasti kasutatakse horisontaalvoolulisi pinnasfiltreid üksikute majade või väiksemate kogukondade olmereovee puhastamiseks. Selliste süsteemide põhiprobleem on kalduvus ummistuda. Horisontaalfiltri pind on isoleeritav ja seega säilib veepuhastusvõime ka talvistes tingimustes (Kadlec & Wallace 2009).

### **1.3.1.3. Vertikaalvoolulised pinnasfiltrid**

Vertikaalvooluga pinnasfiltri puhul võib vee liikumissuund erineda olenevalt sellest, kas vett pumbatakse alt üles või imbub vesi raskusjõu mõjul filtri pinnalt alumiste kihtide suunas. Imbumise soodustamiseks võivad vertikaalvoolulistes pinnasfiltris olla erineva hüdraulilise juhtivusega kihid - pealmine kiht on sellisel juhul väiksema terasuurusega (nt liiv) ja alumine kiht suurema läbimõõduga (nt kruus), mis soodustab põhja imbunud vee kiiremat äravoolu. Põhja võib paigaldada ka torustiku, mille abil saab süsteemi lisaks õhutada. Filtri pind võib samuti olla taimestatud ning enamasti on vertikaalfiltri pindala horisontaalfiltri pindalast väiksem (kuni 0,5 ha [Xanthoulis *et al.*, 2008]).

Vertikaalvoolulise pinnasfiltri puhul on tegemist aeroobse süsteemiga, mis on sobiv keskkond orgaanilise aine oksüdatsiooniks aga ka nitrifikatsiooniprotsessi läbiviimiseks, mis võimaldab suuremate lämmastikukoguste käitlust neis süsteemides. Parema aeratsiooni tõttu on vertikaalfiltreid kasutatud näiteks prügila nõrgvee, samuti põllumajanduse ning toidutööstuse heitvee puhastamiseks (Fonder & Headley 2013; Vymazal 2011).

### **1.3.1.4. Kombineeritud tehismärgalapuhastid**

Kombineeritud tehismärgalapuhastid ( hübriidsüsteemid) kasutavad ära nii vabaveeliste tehismärgalapuhastite kui ka pinnasfiltrite kasulikumaid omadusi. Kõige levinumad

kombinatsioonid on vertikaalfilter ning sellele järgnev horisontaalfilter või horisontaalfiltrile järgnev vertikaalfilter, kuid põhimõtteliselt võib puhastusefektiivsuse suurendamiseks moodustada tehismärgalapuhastitest ükskõik milliseid kombinatsioone (Vymazal 2011).

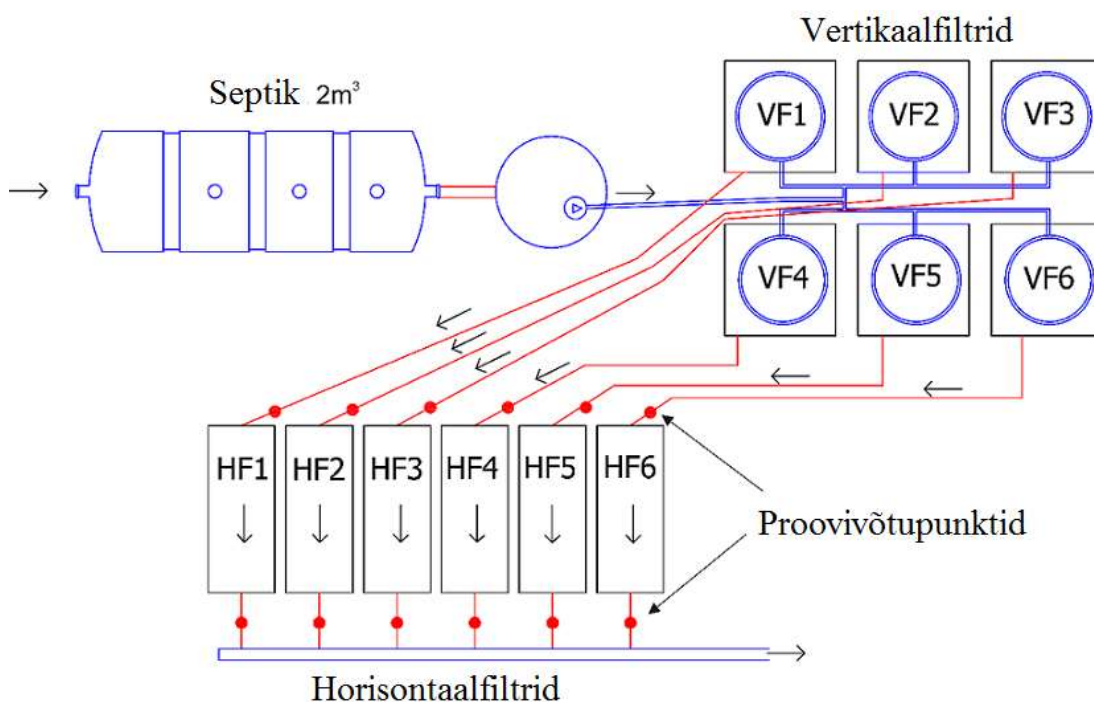
Näiteks on vertikaal-horisontaalfilter süsteemi rakendamise tulemuseks efektiivsem lämmastikuärastus. Vertikaalvoolulistes pinnasfiltrites toimub nitrifikatsioon ning heljumi ja orgaanilise aine eemaldamine. Horisontaalfiltris toimub denitrifikatsioon ning jätkub ka orgaanilise aine ning heljumi eemaldamine (Vymazal 2011).

## 2. Materjal ja metoodika

Käesoleva magistritöö materjal on kogutud eksperimentaalse uurimuse käigus, mis korraldati 1. septembrist kuni 6. oktoobrini 2014 projekti „Ravimijäägid ja sünteetilised nanoosakesed reovees: mõju reoveepuhastusprotsessidele ja ravimiresistentsuse geenide levikule keskkonnas“ raames.

### 2.1. Katsesüsteemi kirjeldus

Uuritud katsesüsteem asus Tartu maakonnas AS Emajõe Veevärgile kuuluva Nõo aleviku aktiivmudapuhasti territooriumil. Nõo aktiivmudapuhasti puhastab nii aleviku ühisveevärgi kui ka AS Nõo Lihatööstuse reovett. Puhastusprotsessi läbinud heitvesi suunatakse Nõo oja.



**Joonis 3.** Nõo kombineeritud tehismärgalapuhasti katsesüsteemi skeem.

Katsesüsteemi sisse voolav vesi võeti aktiivmudapuhasti sissevoolust. Reovesi pumbati esmalt septikusse ( $2\text{ m}^3$ ), milles reovesi viibis umbes 2 ööpäeva (Joonis 3). Septikust pumbati vesi vahekaevu ja sealt edasi kuude paralleelsesse kombineeritud filtersüsteemi, mis koosnesid järjestikku paiknevast vertikaalfiltrist (VF; ruumala  $1\text{ m}^3$ ) ja horisontaalfiltrist (HF; pikkus 1,5 m, laius 0,6 m, sügavus 0,6 m ja ruumala  $0,54\text{ m}^3$ ). Koormus igale osasüsteemile oli 60 l reovett ööpäevas. VF-te pind oli kaetud 20 cm paksuse kergkruusa kihiga, aktiivne filter oli 60 cm paks (fraktsiooni suurus 2-4 mm) ja põhjas asus 20 cm paksune dreanaaži kiht.

Jaotustoru paiknes aktiivse VF-i pinna kattekihi sees. HF-d olid täidetud Ø 4-10 cm kergkruusa fraktsiooniga. Reovesi (5 l iga 2 tunni järel) jaotati võimalikult ühtlaselt VF pinnale. Igast VF-st liikus eelpuhastuse läbinud reovesi gravitatsiooni jõul edasi vastavasse horisontaalfiltrisse (viibeag 2 ööpäeva).

Katse käigus suurendati alasüsteemide 1 ja 4 VF-te sissevoolus sünteetiliste hõbeda nanoosakeste (kollargool) ja alsüsteemide 2 ja 5 VF-te sissevoolus hõbenitraadi kontsentratsiooni reovees 0,1 mg Ag/l võrra. AgNO<sub>3</sub> abil uuriti, kas hõbe ioonsel kujul mõjub mikroobidele teisiti kui hõbe nanoosakestena. Alasüsteemid 3 ja 6 olid kontrollid, kuhu hõbedat ei lisatud.

## **2.2. Vee ja filtermaterjali proovide kogumine**

Filtermaterjali proovid koguti enne nanoosakeste ja AgNO<sub>3</sub> lisamise algust 1. septembril ja peale katse lõppu 6. oktoobril 2014. Igast VF-st võeti 3 osaproovi (umbes 200 g) kühvliga aktiivse filtri pealmisest 0-10 cm kihist (jaotustoru alt). Igast HF-st võeti mullapuuriga (Ø 5 cm) 3 proovi (sissevoolu lähedalt, filtri keskelt ja väljavoolu lähedalt) filtri 20-40 cm sügavusest kihist. Valitud kihtide sügavustel on mikroobide arvukus kõige suurem (Truu *et al.* 2009). Kogutud filtermaterjali proove säilitati kuni DNA eraldamiseni – 20 °C juures.

Veeproovid (á 1 liiter) võeti vahekaevust, VF ja HF väljavoolust iga 7 päeva järel kogu katseperioodi jooksul (kokku kuus korda). Kokku võeti 78 veeproovi. Esimene veeproov võeti enne nanoosakeste ja AgNO<sub>3</sub> lisamise algust. Veeproovidest määrati katsealal kohe pH, temperatuur ja O<sub>2</sub>. Veeproove säilitati jahekastis kuni laborisse jõudmiseni ja laboris kuni analüüsimiseni +4 °C juures. OÜ Eesti Keskkonnauuringute Keskuse Tartu laboris määrati kogutud reovee- ja heitveeproovidest, NH<sub>4</sub>-N, NO<sub>3</sub>-N, üldfosfori (üldP) ja PO<sub>4</sub>-P sisaldus. Üldsüsinik (üldC) ja üldlämmastik (üldN) veest määrati TÜ Geograafia osakonna biogeokeemia laboris. Ag sisaldus nii septikust väljatulevas vees (vahekaevus) kui kõikide filtrite väljavooludes määrati igal veeproovivõtukorral Tallinna Tehnikaülikooli Keemia instituudi laboris kasutades aatomadsorptsioonspektroskoopia meetodit.

Kõik vee- ja filtermaterjaliproovid võeti Tartu Ülikooli ÖMI geograafia osakonna keskkonnamikrobioloogia töögrupi töötajate poolt. Katsesüsteemi (VF-tesse) sissevoolava vee füüsikalise-keemiliste näitajate keskväärtused ja varieerumine katseperioodi jooksul on toodud tabelis 1.

Katsesüsteemi VF-te ja HF-te ja kõigi osasüsteemide puhastusefektiivsused (PE, %) on leitud järgmise valemi (1) abil:

$$\text{Puhastusefektiivsus} = \frac{(C_{\text{sisse}} - C_{\text{välja}}) \times 100}{C_{\text{sisse}}} \quad (1);$$

kus:

- $C_{\text{sisse}}$  – sissevoolu keskmine väärtus ( $\text{mg l}^{-1}$ );
- $C_{\text{välja}}$  – väljavoolus mõõdetud tulemuste keskmine väärtus ( $\text{mg l}^{-1}$ ).

**Tabel 1.** Katsesüsteemi vahekeavu reovee füüsikalis-keemiliste näitajate keskväärtused ja standardhälbed (SH) katseperioodi vältel. Kasutatud lühendid: T – temperatuur, ÜldC – üldsüsinik, ÜldN – üldlämmastik,  $\text{NH}_4\text{-N}$  – ammoniumlämmastik,  $\text{NO}_3\text{-N}$  – nitraatlämmastik, ÜldP – üldfosfor,  $\text{PO}_4\text{-P}$  – fosfaatfosfor, Ag - hõbe.

	T (°C)	O <sub>2</sub> (mg/l)	pH	ÜldC (mgC/l)	Heljum (mg/l)	ÜldN (mgN/l)	NH <sub>4</sub> -N (mg/l)	NO <sub>3</sub> -N (mg/l)	ÜldP (mg/l)	PO <sub>4</sub> -P mgP/l	Ag (µg/L)
Parameeter	n=6	n=6	n=6	n=6	n=6	n=6	n=6	n=6	n=3	n=2	n=6
Keskmine	14,64	0,44	7,01	194,17	143,33	107,33	77,33	0,12	18,00	15,00	1,14
SH	0,74	0,64	0,03	24,91	32,04	18,70	14,24	0,07	4,24	1,41	0,35

**Tabel 2.** Bakterite 16S rRNA geeni ja antibiootikumiresistentsusgeenide arvukused vahekaavu reoveeproovis ning antibiootikumiresistentsusgeenide osakaal bakterite koosluses enne katse algust (1.09.2014).

Parameeter	16S rRNA	<i>sul1</i>	<i>tetA</i>	<i>blaCTX-M</i>
Arvukus (koopiat g-1 KA-1)	$7,65 \cdot 10^8$	$4,29 \cdot 10^6$	$7,82 \cdot 10^5$	$7,16 \cdot 10^4$
Osakaal üldarvukusest (%)	-	0,3332	0,0182	0,0148

### 2.3. DNA eraldamine

DNA eraldamiseks 10 g filtermaterjalist kasutati PowerMax Soil DNA Isolation Kit'i (MoBio, USA). Eraldamine toimus vastavalt tootja poolt soovitatud protokollile. Erandiks oli DNA eraldamise viimane etapp, kus DNA saagise suurendamiseks pesti filtrit kahe korra asemel kolm korda vastava puhverlahusega. DNA kontsentratsiooni mõõdeti spektrofotomeetriga Infinite 200M (Tecan AG, Grödig, Austria) ja DNA säilitati järgnevate analüüsideni -20 °C juures. Filtermaterjali proovidest eraldas DNA töö autor.

Reoveeproove tsentrifuugiti 4000 rpm 15 minutit ning DNA eraldati sademest PowerSoil DNA Extraction Kit (Mo Bio Laboratories, Inc.) abil. Tootja protokoll muudeti, asendades 10 minutit vortexi kasutamist proovide homogenisatsiooniga 5000 rpm 20 sekundit, kasutades Precellys® 24 (Bertin Technologies, France). Veeproovide DNA eraldamiseks kasutati 50 ml reovett. Reoveeproovidest eraldas DNA Kertu Tiirik.

## **2.4. Kvantitatiivne polümeraasi ahelreaktsioon ja esmane andmeanalüüs**

Kvantitatiivse polümeraasi ahelreaktsiooniga (*quantitative Polymerase Chain Reaction* qPCR) määrati nii reovee- kui filtermaterjali proovidest bakterite 16S rRNA geeni ja kolme ARG arvukus. Valitud resistentsusgeenid kodeerivad erinevate laialtlevinud AB-rühmade resistentsust: *tetA* annab resistentsuse tetratsükliinidele, *blaCTX-M*  $\beta$ -laktaamidele ning *sulI* sulfoonamiididele. Sulfoonamiid on AB, mida looduslikult ei esine ning on seega inimtegevuse tagajärjel tekkinud resistentsuse indikaator.

### **2.4.1. qPCR tingimused**

qPCR viidi läbi *RotorGene® Q* (QIAGEN, Foster City, CA, USA) masinas, rakendades *RotorGene Series Software version 2.0.2* (Qiagen) tarkvara. Reaktsioonisegu lõppmaht oli 10  $\mu$ l ning see sisaldas 5  $\mu$ l *Maxima SYBR Green Master Mix* reagenti (Thermo Fisher Scientific Inc., MA, Waltham, USA), optimeeritud kontsentratsioonis geenispetsiifilisi praimereid, 1  $\mu$ l eraldatud DNAd ja ülejäänud mahus steriliseeritud destilleeritud vett.

Märklaudgeenide spetsiifilised praimerid, optimeeritud reaktsioonitingimused ja qPCR amplifikatsiooniprogrammid on toodud tabelis 3. Kvantifitseerimiseks kasutati märklaudgeene sisaldavate plasmiidide lähtelahuseid kontsentratsiooniga  $10^9$  geenikoopiat  $\mu$ l<sup>-1</sup> (Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Saksamaa), millest valmistati standardlahjendused vahemikus  $10^8$  kuni 25 koopiat mikrolitris. Standardlahjendusi kasutati qPCR kvantifitseerimisstandardi koostamiseks, mis toimus igale geenile optimeeritud tingimustel sarnaselt keskkonnaproovidega (tabel 3). qPCR amplifikatsioonireaktsioonile järgnes sulamiskõvera määramine vahemikus 70°C kuni 95°C (0,35°C/3 s) pideva fluorestsentsignaali mõõtmisega. Kõik proovid amplifitseeriti kolmes korduses ja igale mõõtmisele lisati negatiivne kontroll, mis sisaldas enamikku reaktsioonisegu komponente (välja arvatud DNA).



**Tabel 3.** qPCR praimerid ja amplifikatsiooni tingimused.

Sihtmärkgeen	Praimerid	Praimeri primaarjärjestus	Amplikoni suurus (bp)	Praimeri kontsentratsioon (µM)	Praimeri kirjandusviide	qPCR programm
16S rRNA	517F 1028R	GCCAGCAGCCGCGGTAA CGACARCCATGCASCACCT*	530	0,6 0,6	Liu <i>et al.</i> 2007 Dethlefsen <i>et al.</i> 2008	50°C 2 min, 95°C 10 min, 45 tsükli: 95°C 30 s, 60°C 45 s, 72°C 45 s
<i>tetA</i>	<i>tetA</i> -F2 <i>tetA</i> -R2	TCAATTTCTGACGGGCTG GAAGCGAGCGGGTTGAGAG	96	0,8 0,8	Börjesson <i>et al.</i> 2009	50°C 2 min, 95°C 10 min, 45 tsükli: 95°C 15 s, 58°C 30 s, 72°C 30 s
<i>sulI</i>	<i>sulI</i> -F <i>sulI</i> -R	CTGAACGATATCCAAGGATTYCC* AAAAATCCCATCCCCGGRTC*	239	0,8 0,8	Heuer <i>et al.</i> 2008	50°C 2 min, 95°C 10 min, 45 tsükli: 95°C 15 s, 54°C 30 s, 72°C 30 s
<i>blaCTX-M</i>	CTX-M UP CTX-M LP	ACCAAYGATATYGCGGTGAT* ACATCGCGYCGGCMRTCT*	101	0,6 0,6	Muudetud Colomer-Lluch <i>et al.</i> 2011	50°C 2 min, 95°C 10 min, 45 tsükli: 95°C 15 s, 56°C 30 s, 72°C 30 s

\* R tähistab A või G nukleotiidi, Y tähistab C või T nukleotiidi, M tähistab A või C nukleotiidi, S tähistab G või C nukleotiidi

#### 2.4.2. qPCR andmete rühmitamine ja koopiaarvude leidmine

Järgnevalt analüüsiti *RotorGene Series Software version 2.0.2* tarkvaraga kõiki proovide amplifikatsioonikõveraid ja sulamiskõverate paiknemist ning kuju. Individuaalsete proovide amplifikatsiooniefektiivsusi analüüsiti lisaks programmiga *LinRegPCR version 2012.3* (Ruijter *et al.*, 2009). Ühesuunalise dispersioonanalüüsiga (ANOVA) kontrolliti võimalike proovirühmade erinemist üksteisest ( $p < 0,05$ ). Tulemuste põhjal rühmitusid vertikaalfiltri proovid ajaliselt (septembri ning oktoobri proovid eraldi rühmadeks). Horisontaalfiltri proovide puhul proovide rühmitumist ei tuvastatud.

Koopiaarvud jagati läbi proovi kuivainesisaldusega ja esitati kujul geenikoopiat g-1 KA-1. Lisaks arvutati ARG-de osakaal filtermaterjali bakterikoosluses, jagades resistentsusgeeni (A) 16S rRNA arvukusega (B) vastavalt valemile (2) (Ruijter *et al.* 2009)

$$\text{Kordsusaste} = N_{0,A} / N_{0,B} = (N_{t,A} / E_{ACt,A}) / (N_{t,B} / E_{BCt,B}) \quad (2)$$

kus:

$N_0$  – amplikonide A ja B algkontsentratsioon fluorestsentsühikutes

$E$  – vastavate amplikonide amplifikatsiooniefektiivsus

$N_t$  – fluorestsentsi läviväärtus

$C_t$  – läviväärtuse saavutamiseks kulunud amplifikatsioonitsükli arv

Uuritavas proovis sisalduva geeni koopiaarv saadi leitud kordsusastme korrutamisel vastava standardlahjenduse kontsentratsiooniga. Uuritava geeni lõplik koopiaarv igas proovis leiti kvantifitseerimisstandardi eri punktide alusel saadud koopiaarvude ja korduvmõõtmiste geomeetrilisel keskmistamisel. Koopiaarvud taandati proovi kuivainesisaldusega ja esitati kujul geenikoopiat g-1 KA-1.

Ühe filtri kolme proovivõtupunkti tulemused esitati filtri aritmeetilise keskmisena. Lisaks arvutati ARG-de osakaal filtermaterjali bakterikoosluses, taandades ARGi arvukuse (A) 16S rRNA arvukusega (B) vastavalt valemile [1].

Reovee geenikoopiate arvukused määras Kertu Tiirik. Filtermaterjali koopiaarvud määras käesoleva töö autor.

Bakterite 16S rRNA geeni ja analüüsitud ARG-de arvukused ja ARG proportsioonid bakterikooslustes süsteemi (VF-tesse) sissevoolavas reovees on toodud tabelis 2. Uuritud

filtrite 16S rRNA ning ARG-ide arvukused ja proportsioonid katseperioodi jooksul on toodud tabelites 5 ja 6.

Määratud geenide arvukuse muutused filtermaterjalis ( $S_{AF}$ ) ja filtritest väljavoolavas vees ( $S_{AV}$ ) katseperioodi jooksul arvutati järgmise valemite järgi:

$$S_{AF} = \frac{A_{okt}}{A_{sept}} \quad (3)$$

$$S_{AV} = ((A_{V_{okt}}/A_{S_{okt}}))/((A_{V_{sept}}/A_{S_{sept}})) \quad (4)$$

kus:

$A_{okt}$  on geeni arvukus oktoobris filtermaterjalis

$A_{sept}$  on geeni arvukus septembris filtermaterjalis

$A_{V_{okt}}$  on geeni arvukus oktoobris filtri väljavoolus

$A_{S_{okt}}$  on geeni arvukus oktoobris filtri sissevoolus

$A_{V_{sept}}$  on geeni arvukus septembris filtri väljavoolus

$A_{S_{sept}}$  on geeni arvukus septembris filtri sissevoolus

### 3. Tulemused

#### 3.1. Reovee keemiliste näitajate muut filtersüsteemides

Katsesüsteemi sissetuleva reovee pH oli keskmiselt 7,01 ning varieerus katseperioodi jooksul suhteliselt vähe. Suurendatud nanoosakeste sisaldusega osasüsteemides tõusis pH väärtus VF-tes keskmiselt 0,3 ühikut, HF-tes 0,4 ja kogu süsteemis keskmiselt ligi 0,7 ühikut. AgNO<sub>3</sub> töötlusega süsteemides tõusis pH väärtus vastavalt ligi 0,2, 0,3 ja 0,5 ühikut ning kontrollis 0,3, ligi 0,5 ja 0,8 ühikut (tabel 4).

Suurem osa reoveega süsteemi sissetulevast Ag-st seoti VF-tesse. Ag sisaldus VF-te väljavooludes oli nano- ja AgNO<sub>3</sub> süsteemide puhul suhteliselt sarnane (keskmiselt vastavalt 4,55 µg/l ja 4,34 µg/l) ja ületas tunduvalt kontrollsüsteeme, kus see näitaja oli keskmiselt 1,3 µg/l. HF-tes toimus edasine Ag sidumine, kuna nende filtrite väljavooludes oli Ag sisaldus juba nanosüsteemides keskmiselt 0,13 µg/l ja AgNO<sub>3</sub> ning kontrollsüsteemides alla määramispiiri (<0,10 µg/l).

Süsiniku eemaldamise efektiivsus oli madalaim nanosüsteemides (VF-tes keskmiselt 78,6%, HF-tes 28,0% ja kogu süsteemis 84,3%). AgNO<sub>3</sub> süsteemides ja kontrollsüsteemides oli süsiniku eemaldamise efektiivsus suhteliselt sarnane (keskmiselt vastavalt 82,5%, 20,7% ja 85,6% ning 82,0, 18,5% ja 85,2%). Suur erinevus süsiniku eemaldamise efektiivsuses ilmnis katsevariantide kahe paralleelsüsteemi vahel just HF-tes. Lämmastiku eemaldati nanosüsteemide VF-tes keskmiselt 34,8%, HF-tes 19,8% ja kogu süsteemis keskmiselt 47,5%. AgNO<sub>3</sub> süsteemides eri osade ja ka kogu süsteemi puhastusefektiivsused olid madalamad kui nanosüsteemide vastavad näitajad (keskmiselt 31,9%, 16,8% ja 42,9%) kuid siiski kõrgemad kui kontrollsüsteemide vastavad näitajad (keskmiselt 28,8%, 14,5% ja 38,5%). Fosfori eemaldamise efektiivsus oli nanosüsteemide VF-tes keskmiselt 24,2%, HF-tes 11,4% ja kogu süsteemis 29,7% ja AgNO<sub>3</sub> süsteemides keskmiselt vastavalt 17,4%, 24,6% ja 24,9% samal ajal kui kontrollsüsteemide VF-tes oli see näitaja keskmiselt 16,7%, HF-tes 5,9% ja kogu süsteemis kokku keskmiselt 21,4%.

**Tabel 4.** Vertikaal – ja horisontaalvooluliste pinnasfiltrite (vastavalt VF ja HF) ja kõigi osasüsteemide (VF+HF) puhastusefektiivsused (%), reovee pH muutude ( $\Delta$ pH) ning Ag sisalduse keskväärtused ja standardhälbed (sulgudes) filtrite väljavoolus prooviperioodi jooksul. Numbrid tähistavad katsesüsteemi osasüsteeme (OS).

Katse-variant	OS	Puhastusefektiivsused									ΔpH		Ag sisaldus (μg/l)	
		Üldsüsinik			Üldlämmastik			Üldfosfor						
		VF	HF	VF+HF	VF	HF	VF+HF	VF	HF	VF+HF	VF	HF	VF	HF
		n=6	n=6	n=6	n=6	n=6	n=6	n=4	n=4	n=4	n=6	n=6	n=6	n=6
Nano	1	81,2 (8,8)	19,4 (6,6)	84,7 (7,8)	36,7 (9,4)	10,4 (9,6)	42,8 (14,4)	27,1 (33,4)	7,68 (6,72)	27,5 (24,3)	0,2 (0,14)	0,3 (0,03)	2,09 (1,50)	0,21 (0,35)
	4	75,9 (7,4)	35,8 (5,1)	83,8 (7,0)	32,9 (10,4)	29,2 (7,0)	52,2 (13,5)	21,3 (10,6)	15,2 (9,9)	31,8 (17,3)	0,4 (0,21)	0,4 (0,04)	7,01 (3,85)	0,05 (0,13)
AgNO <sub>3</sub>	2	84,1 (6,7)	11,2 (12,7)	85,9 (7,5)	28,7 (11,8)	11,8 (9,3)	36,7 (16,0)	6,2 (11,1)	10,5 (13,5)	15,5 (19,7)	0,1 (0,12)	0,3 (0,04)	1,90 (0,98)	0,10 (0,16)
	5	80,0 (6,6)	30,1 (16,1)	85,3 (8,5)	35,1 (11,7)	21,8 (11,7)	49,0 (13,6)	15,3 (11,0)	24,2 (23,8)	34,2 (27,5)	0,2 (0,09)	0,3 (0,06)	6,78 (3,70)	0,01 (0,02)
Kontroll	3	83,4 (5,7)	13,8 (16,9)	85,2 (7,8)	31,6 (11,0)	13,7 (7,1)	40,4 (12,4)	18,6 (11,1)	4,2 (29,7)	21,5 (30,9)	0,4 (0,08)	0,5 (0,06)	0,51 (0,53)	0
	6	80,7 (9,2)	23,1 (7,8)	85,2 (7,1)	25,9 (12,3)	15,2 (10,0)	36,6 (16,6)	14,8 (9,5)	7,6 (15,4)	21,2 (15,8)	0,2 (0,07)	0,4 (0,04)	2,09 (1,09)	0,02 (0,05)

## 3.2. Uuritud geenide arvukused filtermaterjali proovides

### 3.2.1. Bakterite 16S rRNA geeni arvukus

Bakterite üldarvukust iseloomustav 16S rRNA geeni arvukus oli VF-tes katseperioodi vältel vahemikus  $5,39 \times 10^5$  kuni  $7,35 \times 10^6$  koopiat g-1 KA-1 ja HF-tes vahemikus kuni  $2,57 \times 10^5$  kuni  $1,02 \times 10^6$  koopiat g-1 KA-1 (tabel 5).

**Tabel 5.** Bakterite 16S rRNA geeni ja antibiootikumiresistentsusgeenide koopiaarvud vertikaal – ja horisontaalvooluliste pinnasfiltrite (vastavalt VF ja HF) filtermaterjali bakterikooslustes enne katse algust (1.09.2014) ja peale katse lõppu (6.10.2014). Numbrid tähistavad katsesüsteemi osasüsteeme (OS). Lühendid: KV – katsevariant, KA- kuivaine.

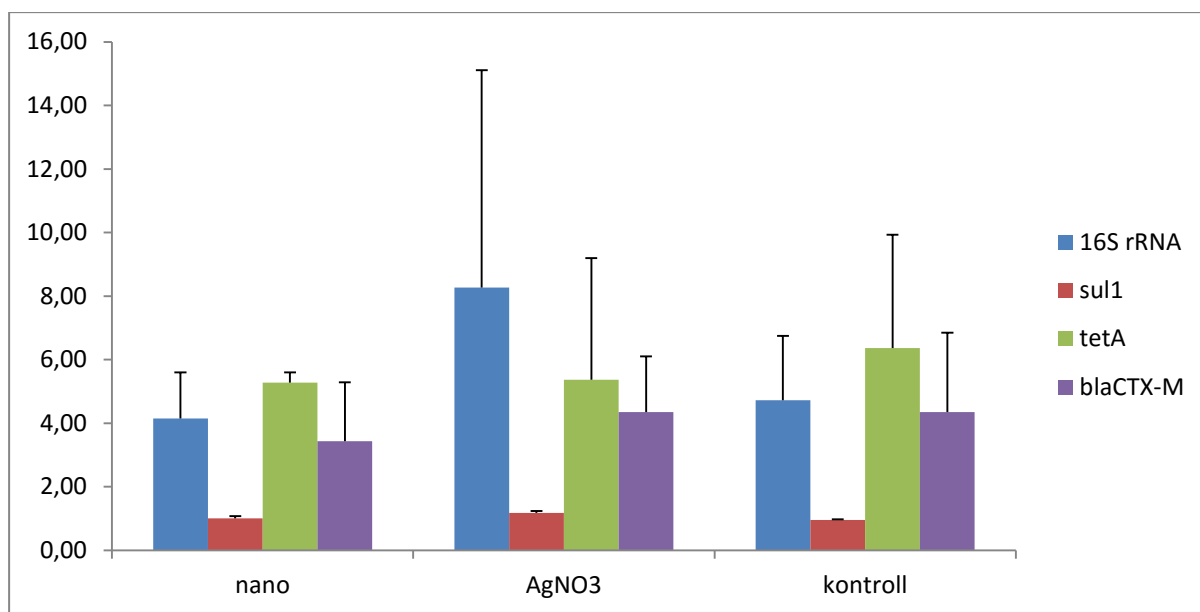
Kuu-päev	KV	OS	Geenide arvukused (koopiat g-1 KA-1)							
			16S rRNA		<i>sul1</i>		<i>tetA</i>		<i>blaCTX-M</i>	
			VF	HF	VF	HF	VF	HF	VF	HF
1.09.2014	Nano	1	$1,42 \times 10^6$	$1,02 \times 10^6$	$3,16 \times 10^3$	$2,88 \times 10^3$	149	67	904	28
		4	$1,52 \times 10^6$	$7,56 \times 10^5$	$2,24 \times 10^3$	$2,97 \times 10^3$	89	80	$1,23 \times 10^3$	18
	AgNO <sub>3</sub>	2	$1,39 \times 10^6$	$5,60 \times 10^5$	$4,75 \times 10^3$	914	82	18	865	24
		5	$5,47 \times 10^5$	$4,22 \times 10^5$	$1,06 \times 10^3$	$1,77 \times 10^3$	63	33	523	<10
	Kontroll	3	$1,52 \times 10^6$	$3,53 \times 10^5$	$2,78 \times 10^3$	855	119	66	$1,06 \times 10^3$	15
		6	$5,39 \times 10^5$	$7,29 \times 10^5$	633	$1,90 \times 10^3$	26	59	291	26
6.10.2014	Nano	1	$7,35 \times 10^6$	$5,81 \times 10^5$	$3,34 \times 10^3$	$1,92 \times 10^3$	823	41	$4,29 \times 10^3$	13
		4	$4,74 \times 10^6$	$6,19 \times 10^5$	$2,15 \times 10^3$	$2,30 \times 10^3$	450	66	$2,62 \times 10^3$	15
	AgNO <sub>3</sub>	2	$4,77 \times 10^6$	$5,42 \times 10^5$	$5,38 \times 10^3$	$1,28 \times 10^3$	218	13	$2,69 \times 10^3$	18
		5	$7,16 \times 10^6$	$5,77 \times 10^5$	$1,29 \times 10^3$	$1,56 \times 10^3$	512	31	$2,92 \times 10^3$	16
	Kontroll	3	$4,99 \times 10^6$	$2,57 \times 10^5$	$2,61 \times 10^3$	819	458	59	$2,75 \times 10^3$	<10
		6	$3,32 \times 10^6$	$5,36 \times 10^5$	615	$1,02 \times 10^3$	233	26	$1,78 \times 10^3$	<10

Katseperioodi lõpuks olid selle geeni arvukused suurenenud (võrreldes katse-eelse tasemega) kõikides VF-tes, kusjuures kontrollis oli see suurenemine keskmiselt ligi 4 korda, nanosüsteemides 4,1 korda ja AgNO<sub>3</sub> süsteemides 6,2 korda (joonis 4). HF-tes toimus aga selle geeni arvukuse vähenemine - nanosüsteemides keskmiselt 1,5, AgNO<sub>3</sub> süsteemides 1,1 ja kontrollsüsteemides 1,4 korda (joonis 5).

### 3.2.2. ARG-de arvukused

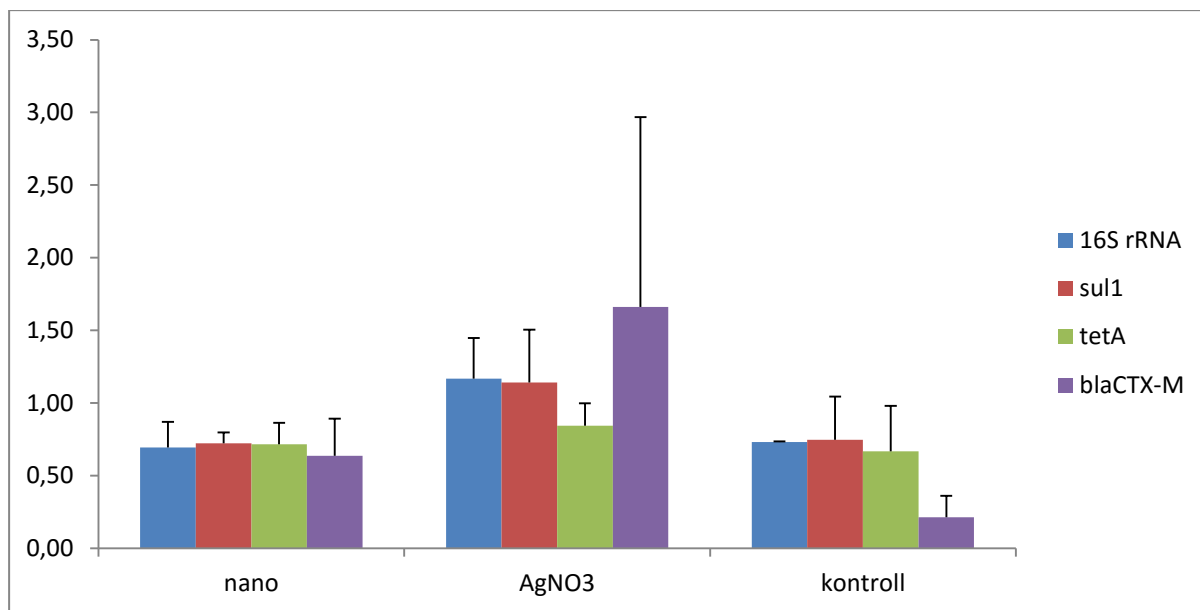
Kõik analüüsitud ARG-d olid tuvastatavad nii vee- kui filtermaterjali proovidest kõigil proovivõtu aegadel. Määratud ARG-de arvukused uuritud filtermaterjali proovides on toodud tabelis 5.

*Sul1* geeni arvukus VF-tes oli katseperioodi vältel vahemikus  $6,15 \times 10^2$  kuni  $5,38 \times 10^3$  koopiat g-1 KA-1 ning HF-tes vahemikus  $8,19 \times 10^2$  kuni  $2,97 \times 10^3$  koopiat g-1 KA-1. Katseperioodi lõpuks oli selle geeni arvukus vähenenud nii VF kui HF kontrollsüsteemis (VF-is keskmiselt 1,1 korda ning HF-is 1,5 korda) (joonis 4 ja 5). Kui nanosüsteemide puhul selle geeni arvukuses VF-is arvukuse muutust ei täheldatud, siis HF-is toimus arvukuse langus (keskmiselt 1,4 korda). AgNO<sub>3</sub> süsteemides suurenesid *sul1* geeni arvukused katseperioodi jooksul nii VF-s kui HF-s (keskmiselt vastavalt 1,2 ja 1,1 korda).



**Joonis 4.** Bakterite 16S rRNA geeni ja antibiootikumiresistentsusgeenide koopiaarvude muutus (kordades) vertikaalpinnasfiltris katseperioodi lõpuks. Näidatud on katsevariantide aritmeetilised keskmised ja standardhälbed (n=2).

*TetA* geeni arvukus oli katseperioodi kestel VF-tes vahemikus  $2,63 \times 10^1$  kuni  $8,23 \times 10^2$  koopiat g-1 KA-1 ning HF-tes  $1,31 \times 10^1$  kuni  $2,63 \times 10^1$  koopiat g-1 KA-1. Katseperioodi lõpuks olid selle geeni arvukused suurenenud kõigis VF-tes: kontrollis keskmiselt ligi 4,8 korda, AgNO<sub>3</sub> süsteemides 5 korda ning nanosüsteemides 5,3 korda (joonis 4 ja 5). HF-tes toimus aga *tetA* geeni vähenemine: kontrollis keskmiselt 1,5 korda, AgNO<sub>3</sub> süsteemides 1,1 korda ning nanosüsteemides 1,4 korda.



**Joonis 5.** Bakterite 16S rRNA geeni ja antibiootikumiresistentsusgeenide koopiaarvude muutus (kordades) horisontaalpinnasfiltris katseperioodi lõpuks (6.10.2014). Näidatud on katsevariantide aritmeetilised keskmised ja standardhälbed (n=2).

*BlaCTX-M* geeni arvukus oli VF-tes katseperioodi vältel vahemikus  $2,91 \times 10^2$  kuni  $4,29 \times 10^3$  koopiat g<sup>-1</sup> KA-1. Katseperioodi lõpuks oli selle geeni arvukus suurenenud kõigis VF-tes: kontrollis keskmiselt ligi 3,4 korda, AgNO<sub>3</sub> süsteemides 4 korda ning nanosüsteemides 3,2 korda (joonis 4). HF-tes oli *blaCTX-M* arvukus kaks suurusjärku madalam (alla 10 koopia kuni 29 koopiat g<sup>-1</sup> KA-1) kui VF-tes (joonis 5) ning selle geeni arvukuse vähenemine oli märgatav peaaegu kõikides HF-tes (va AgNO<sub>3</sub> osasüsteemis 5).

### 3.3. ARG-de proportsioonid filtermaterjali bakterikoosluses

Töö tulemused näitavad, et uuritud ARG-de osakaal filtermaterjali bakterikooslusest oli 0,0004 kuni 0,2541% (tabel 6).

*Sul1* osakaal jäi VF-te bakterikoosluses katseperioodi vältel vahemikku 0,0152% kuni 0,0976% ning HF-tes 0,0861% ja 0,2541% vahele. Katseperioodi lõpuks olid *sul1* geeni osakaal vähenenud kõigis VF-tes - kontrollsüsteemides keskmiselt 3,4 korda, AgNO<sub>3</sub> süsteemides ligi 3 korda ning nanosüsteemides ligi 4,2 korda (joonis 6). HF-te puhul toimus aga selle geeni osakaalu kasv kontrollsüsteemides (keskmiselt 1,2 korda) ning vähenemine AgNO<sub>3</sub> ja nanosüsteemides mõlemas keskmiselt 1,2 korda (joonis 7).

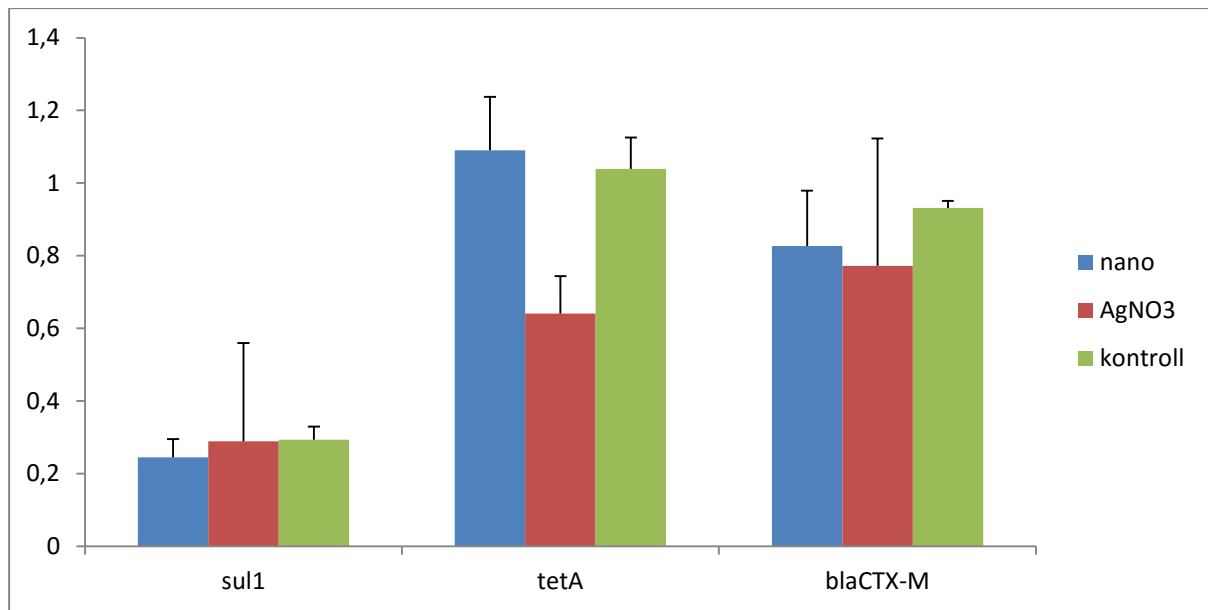


**Tabel 6.** Uuritud antibiootikumiresistentsusgeenide (ARG) osakaalud vertikaal – ja horisontaalvooluliste pinnasfiltrite (vastavalt VF ja HF) filtermaterjali bakterikooslustes enne katse algust (1.09.2014) ja peale katse lõppu (6.10.2014). Numbrid tähistavad katsesüsteemi osasüsteeme (OS). Lühendid: KV – katsevariant.

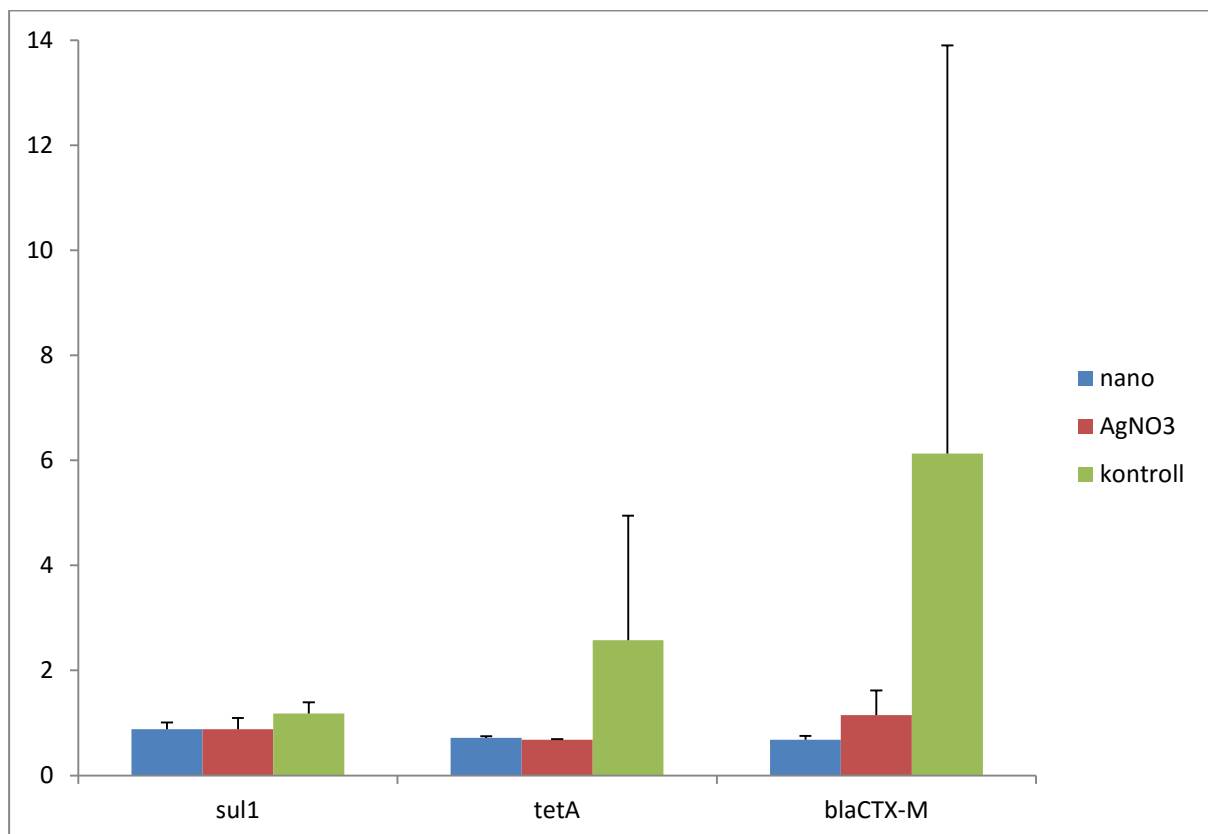
Kuupäev	KV	OS	ARG osakaalud (%)					
			<i>sul1</i>		<i>tetA</i>		<i>blaCTX-M</i>	
			VF	HF	VF	HF	VF	HF
1.09.2014	Nano	1	0,0976	0,1327	0,0016	0,0015	0,0791	0,0040
		4	0,0772	0,2541	0,0013	0,0023	0,1113	0,0035
	AgNO <sub>3</sub>	2	0,1382	0,0861	0,0010	0,0006	0,0737	0,0043
		5	0,0828	0,1390	0,0017	0,0011	0,1161	0,0018
	kontroll	3	0,0794	0,1333	0,0012	0,0040	0,0882	0,0037
		6	0,0568	0,1007	0,0009	0,0006	0,0678	0,0029
6.10.2014	Nano	1	0,0204	0,1291	0,0016	0,0011	0,0739	0,0025
		4	0,0216	0,2005	0,0015	0,0017	0,0801	0,0026
	AgNO <sub>3</sub>	2	0,0664	0,0889	0,0007	0,0004	0,0752	0,0035
		5	0,0081	0,1007	0,0010	0,0008	0,0608	0,0026
	kontroll	3	0,0253	0,1374	0,0013	0,0036	0,0834	0,0023
		6	0,0152	0,1339	0,0009	0,0027	0,0623	0,0340

*TetA* osakaal VF-te bakterikoosluses oli katseperioodi kestel vahemikus 0,0009% kuni 0,0017% ning HF-tes vahemikus 0,0006% kuni 0,0040%. Katseperioodi lõpuks oli selle ARG osakaal VF-te kontrollsüsteemides sarnane (keskmiselt 0,0011%) katse lõpunäiduga, AgNO<sub>3</sub> süsteemides aga langes 1,6 korda ning nanosüsteemides kasvas 1,1 korda (joonis 6). HF-tes toimus *tetA* geeni osakaalu kasv kontrollsüsteemides 1,4 korda ning osakaalu langus nanosüsteemides 1,4 korda ja AgNO<sub>3</sub> süsteemides 1,5 korda (joonis 7).

*BlaCTX-M* osakaal oli VF-te biokile bakterikoosluses katseperioodi kestel vahemikus 0,0608% kuni 0,1161% ning HF-tes 0,0018% kuni 0,0340%. Katseperioodi lõpuks oli selle geeni osakaal vähenenud kõigis VF-tes - kontrollsüsteemides keskmiselt 1,1 korda, AgNO<sub>3</sub> süsteemides 1,4 korda ning nanosüsteemides 1,2 korda (joonis 6). HF-te puhul toimus kontrollsüsteemdes *blaCTX-M* geeni osakaalu suurenemine 5,5 korda, AgNO<sub>3</sub> süsteemides jäi selle ARG osakaal koosluses samale tasemele võrreldes katse-eelse seisuga ning nanosüsteemides langes keskmiselt 1,5 korda (joonis 7).



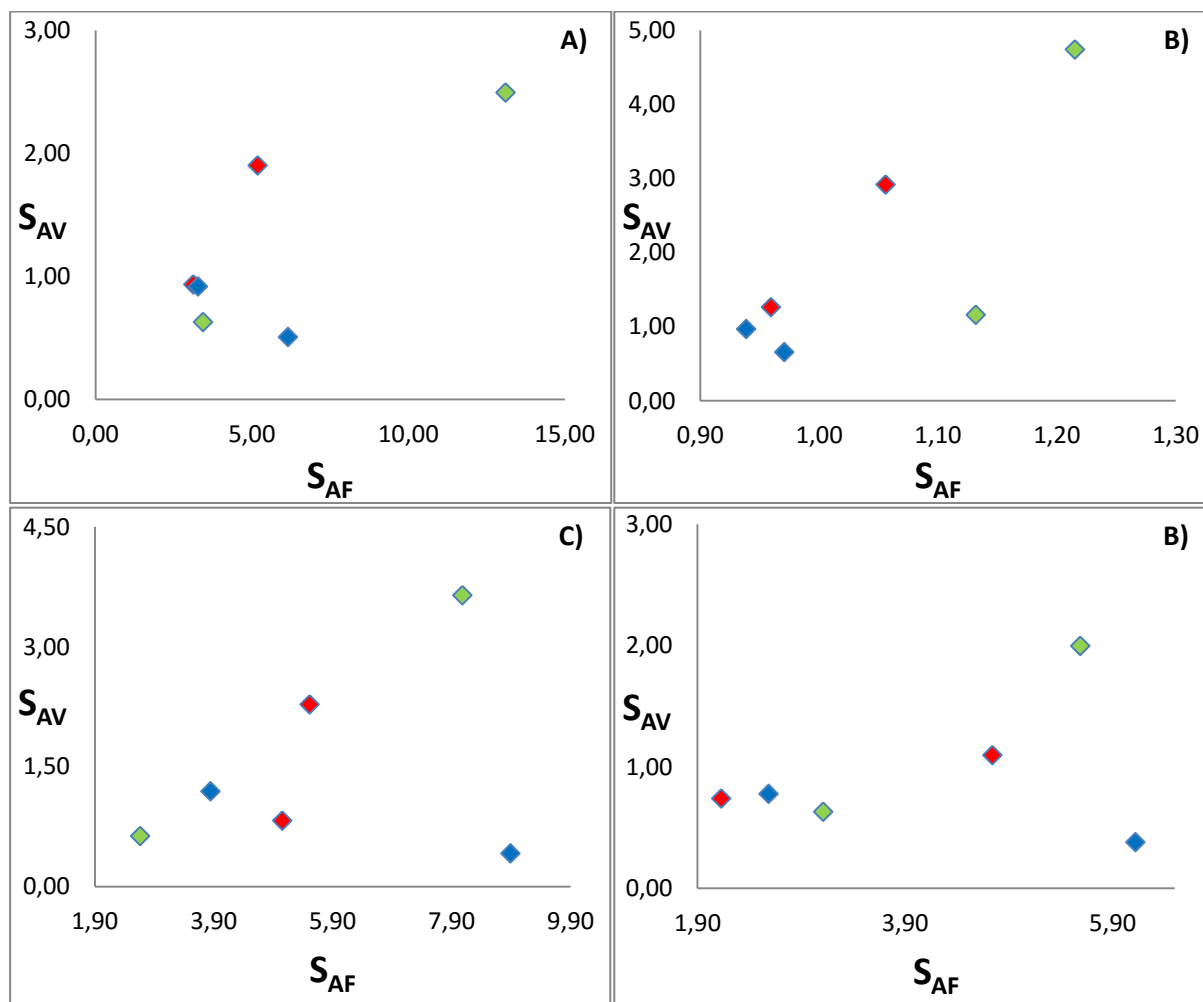
**Joonis 6.** Uuritud antibiootikumiresistentsusgeenide osakaalude muutus (kordades) vertikaalpinnasfiltri filtermaterjali bakterikoosluses katseperioodi lõpuks. Näidatud on katsevariantide aritmeetilised keskmised ja standardhälbed (n=2).



**Joonis 7.** Uuritud antibiootikumiresistentsusgeenide osakaalude muutus (kordades) horisontaalpinnasfiltri filtermaterjali bakterikoosluses katseperioodi lõpuks. Näidatud on katsevariantide aritmeetilised keskmised ja standardhälbed (n=2).

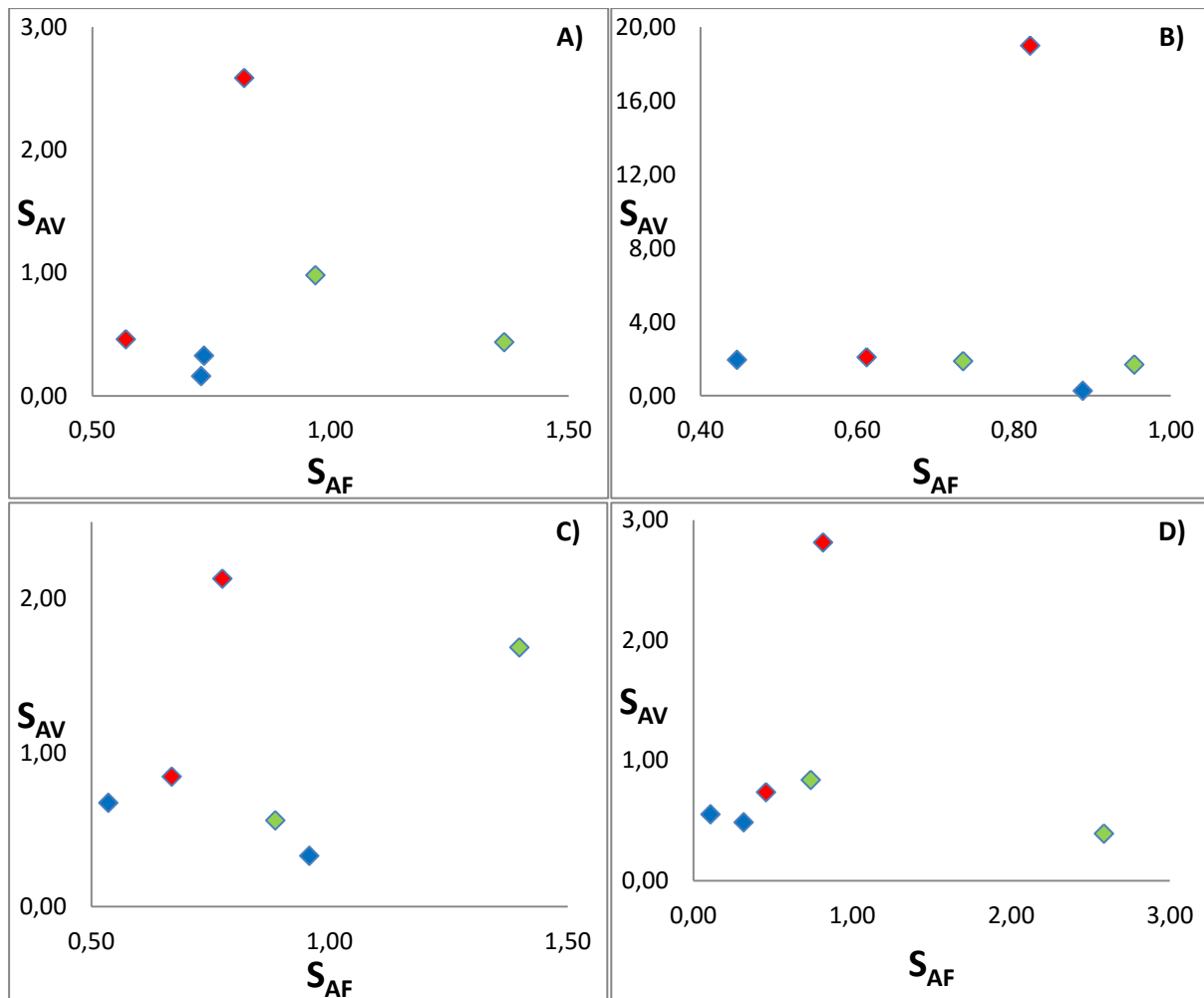
### 3.4. Seos katseperioodil toimunud filtermaterjali ja filtrist väljavoolavas vees toimunud geenide arvukuste muutuste vahel.

Katseperioodi jooksul toimus 16S rRNA geeni arvukuses VF filtermaterjalis tõus, mis oli suurem kui selle geeni arvukuse suurenemine VF-st väljavoolavas vees (Joonis 8A).



**Joonis 8.** Seos geeni arvukuste muutuste vahel VF-i filtermaterjalis ja filtrist väljavoolavas vees katseperioodil (vastavalt  $S_{AV}$  ja  $S_{AF}$ ). A) 16S rRNA geeni arvukuste muutuste suhe, B) *sulI* arvukuste muutuste suhe, C) *tetA* arvukuste muutuste suhe ja D) *blaCTX-M* arvukuse muutuste suhe. Sümbolid: ◆ kontrollsüsteemid, ◆  $AgNO_3$  süsteemid, ◆ nanosüsteemid.

HF-te puhul oli selle geeni muutuse suund ja ulatus nii filtris kui vees sarnane (joonis 9A) ning enamikul juhtudel 16S rRNA geeni arvukus vähenes. *SulI* arvukus VF biokiles eriti ei muutunud (joonis 8B), kuid filtrist väljavoolavas vees arvukus suurenes võrreldes katse algusega nano- ja  $AgNO_3$  süsteemides. HF-te puhul selget muutuste suunda selle geeni puhul näha ei olnud (joonis 9B). Arvukuse suurenemine nii VF-i filtermaterjalis kui ka väljavoolus oli näha *tetA* geeni puhul (joonis 8C), kuid HF-s sellist seost ei ilmnenu (joonis 9C).



**Joonis 9.** Seos geeni arvukuste muutuste vahel HF-i filtermaterjalis ja filtrist väljavoolavas vees katseperioodil (vastavalt  $S_{AV}$  ja  $S_{AF}$ ). A) 16S rRNA geeni arvukuste muutuste suhe, B) *sulI* arvukuste muutuste suhe, C) *tetA* arvukuste muutuste suhe ja D) *blaCTX-M* arvukuse muutuste suhe. Sümbolid: ◆ kontrollsüsteemid, ◆  $AgNO_3$  süsteemid, ◆ nanosüsteemid.

*BlaCTX-M* geeni arvukus suurenes katseperioodil VF-te biokiles, kuid mitte filtrite väljavoolus (joonis 8D). *BlaCTX-M* geeni arvukus üldiselt vähenes nii HF-s kui ka neist filtritest väljavoolus katseperioodi jooksul (joonis 9D).

## 4. Arutelu ja järeldused

Käesolevas töös uuriti sünteetiliste hõbeda nanoosakeste mõju bakterikoosluse arvukusele ja kolme reovees enimuuritud antibiootikumiresistentsusgeeni arvukusele ning osakaalule bakterikoosluses Nõo hübriidse tehismärgalapuhasti eri osades.

Katse tulemused näitavad, et suurem osa puhastussüsteemi sissetulevast hõbedast seoti filtrite (eriti VF-te) materjalis. Üle kolme korra rohkem jõudis hõbedat HF-tesse suurendatud Ag kontsentratsiooniga süsteemides ning kontrollsüsteemi puhul, kuid kõigi katsevariantide HF-te väljavooludes oli hõbeda sisaldus määramispiiri (0,10 µg/l) lähedal või alla selle.

Hõbeda näitude vähenemisel (eriti pärast vertikaalfiltrit) võib olla mitmeid põhjuseid. On teada, et aeroobsetes tingimustes (mis on ka katsesüsteemi vertikaalfiltris) AgNO<sub>3</sub>-dest Ag ioone ei vabane. Lisaks võib hõbe olla seotud biomassi, kuna mikroobid põhjustavad nanoosakeste agregatsiooni, mis vähendab nanoosakeste biosaadavust ja sealjuures toksilisust. Ka võivad mitmed bakteriaalset päritolu orgaanilised ained Ag-NO<sub>3</sub> pinnal stabiilseid komplekse moodustada, mis võib jällegi vähendada nii Ag-NO<sub>3</sub>-de biosaadavust kui toksilisust (Zhang *et al.* 2014).

Orgaanilise aine eemaldamise efektiivsus oli nanosüsteemides pisut madalam nii VF-tes kui ka kogu süsteemis võrreldes kontroll- ja AgNO<sub>3</sub> süsteemidega. Samas oli aga lämmastiku eemaldamise efektiivsus nanosüsteemides kõige kõrgem ning seda ilmselt suurema orgaanilise aine koguse tõttu, mis VF-test HF-tesse jõudes soodustas denitrifikatsiooni (Lu *et al.* 2009). Põhjuseks võib olla ka mikroobikoosluse kohanemine madala hõbeda kontsentratsiooniga. Zhang *et al.* (2014) andmetel ei täheldatud sarnase reovee Ag-nanoosakeste kontsentratsiooni juures (0,10 mg/l) olulisi muutusi ka membraanbioreaktor aktiivmudapuhasti puhastusefektiivsustes (nii süsiniku kui lämmastiku puhul), kuid avastati *silE* (hõbedaresistentsusgeen) geeni arvukuse kasv mikroobikoosluses.

Bakterite üldarvukust iseloomustav 16S rRNA geeni arvukus oli kõigi uuritud filtrite filtermaterjalide biokiledes suurusjärgus 10<sup>5</sup>-10<sup>6</sup> koopiat g<sup>-1</sup> KA-1, mis on samas suurusjärgus teistes uuringutes tehismärgalapuhastistest mõõdetud bakterite arvukustega (Truu *et al.* 2009; Nõlvak *et al.* 2013). Töö tulemused näitavad, et katseperioodi jooksul toimus VF filtermaterjali biokiles bakterite arvukuses kasv, mis ületas bakterite arvukuse kasvu VF-st väljavoolavas vees. HF puhul toimus arvukuse langus, kuid muutuse ulatus oli

nii vees kui filtris sarnane. Muutused bakterite arvukustes olid sarnased nii nanosüsteemide, AgNO<sub>3</sub> süsteemide kui kontrollsüsteemide puhul.

Kõik töös uuritud ARG-d olid tuvastatavad nii algses reovees, puhastussüsteemi filtrite biokiles kui ka süsteemist väljavoolavas heitvees. Võrreldes uuritud süsteemi väljavoolu geenide arvukust kirjanduses saadud puhastusefektiivsustega, selgub, et uuritud kombineeritud tehismärgalapuhasti on väiksem ARG-ide allikas kui näiteks tavaline olmereoveepuhasti. Samuti selgus töö tulemustest, et suurenenud nanoosakeste kontsentratsioon reovees mõjutas ARG-de arvukust ja osakaalu bakterite koosluses. Hõbeda nanoosakeste mõju ARG-e kandvatele bakteritele erines aga Ag-iooni mõjust. Nanosüsteemides oli ARG-de arvukus keskmiselt suurem kui hõbenitraadi töötlusega süsteemides. VF AgNO<sub>3</sub> süsteemis oli ARG-de osakaal suurem ning HF-i puhul olid suurema osakaaluga nanosüsteemide ARG-id.

Kõigi ARG-de arvukus nii nanosüsteemide kui AgNO<sub>3</sub> puhul VF-is kas kasvas või ei muutunud ning langes HF-is. Samuti langesid ARG-de osakaalud kõigis filtrites, välja arvatud *tetA* VF-is, kus oli väike osakaalu tõus. ARG-de arvukus kasvas VF-is ning HF-is langes (v.a *tetA*). Osakaalud langesid kõigis filtrites, v.a *blaCTX-M* HF-is, kus osakaal jäi samaks.

ARG kandjate osakaal koosluses vähenes, kuna muudel mikroobidel võis tekkis hõbeda ning hõbeda nanoosakestega töötlemisel keskkonnas kasvueelis. Kuna hõbedal on bakteritsiidne toime, mis võib olla ARG-ide kandjatele suurema mõjuga kui mõnele teisele mikroobiliigile, oleks vaja uurida puhasti biokile mikroobikoosluse liigilise koosseisu muutust, et selgitada täpsemalt, miks ARG kandvate mikroobide osakaal väheneb. Ka tasuks uurida *silE* geeni arvukust, kuna see võib selgitada üldarvukuse kasvu Ag ning Ag-NO töötluse järgselt.

Kuigi antud töös leiti hõbeda fraktsioonidel mikroobidele erinev mõju, pole teistes sarnastes reoveepuhastussüsteemides funktsionaalsete rühmade uurimisel hõbeda nanoosakeste ja hõbenitraadi erinevat mõju täheldatud (nt Colman *et al.* [2014] uuris 2,5 mg/l kontsentratsiooniga Ag ja Ag-NO mõju nitrifitseerijatele avaveelises tehismärgalapuhastis).

Kõige enam leiti millistest proovidest sulfoonamiidiresistentsust kodeerivat *sulI* geeni. Chen & Zhang (2013), Chen *et al.* (2016), Christgen *et al.* (2015), Mao *et al.* (2015) ning Nõlvak *et al.* (2013) on samuti leidnud, et olmereovees on *sulI* geen üks arvukamaid. Kuna *sulI* on sünteetiliselt päritolu ja looduslikult ei esine, lisandub seda puhastussüsteemi vaid reovee vahendusel.

Kui erinevalt kontrollsüsteemist selle ARG puhul nanosüsteemides VF-is arvukuse muutust ei täheldatud, siis sarnaselt kontrollsüsteemiga toimus HF-s arvukuse langus. Suurendatud Ag-iooni ( $\text{AgNO}_3$ ) kontsentratsiooni toime suurenes aga hoopis *sulI* geeni arvukus nii VF-tes kui HF-tes. Samal ajal vähenes seda ARG-d sisaldavate bakterite osakaal koosluses kõigi katsevariantide puhul.

Võrreldes katse algusega oli *sulI* geeni arvukus nii nanosüsteemi kui  $\text{AgNO}_3$  süsteemi puhul suurenenud VF-te väljavooludes, kuid mitte HF-te väljavooludes. Suurem arvukus VF-te väljavooludes võib tuleneda VF aeroobsete tingimuste paremast sobivusest *sulI* geeni kandvatele organismidele ning samuti võib arvukust väljavoolus mõjutada Ag ioon (mis võib näiteks mõjuda pärssivalt teistele organismidele, andes *sulI* kandjale konkurentsieelise). Ka on *sulI* kandjate puhul märgitud horisontaalset geeniülekannt (Blahna *et al.* 2006), mis muudab koosluse struktuuri ning samuti suurendab *sulI* geeni omavate bakterite arvukust.

Antud töös uuritud süsteemis (kus filtris-väljavoolus) vähenes *sulI* geen 3-4 suurusjärku. Chen & Zhang (2013) töös on leitud *sulI* geeni vähenemine 1-2 suurusjärku olmereoveepuhastis. Makowska *et al.* (2016) uuris samuti *sulI* geeni vähenemist olmereoveepuhastis, kuid see osutus statistiliselt ebaoluliseks.

*TetA* geeni leitud uuritud filtriproovides suurusjärguvõrra vähem kui *sulI* geeni. Selle ARG arvukus muutus sarnaselt kõigis suurendatud Ag koormusega süsteemides: VF-s kasvas, HF-is toimus aga arvukuse langus. Erinevalt nanosüsteemidest vähenes *tetA* osakaal mõlemas kontrollsüsteemide filtri biokiles.

Nagu *sulI* puhul, suurenes ka *tetA* geeni arvukus nii nanosüsteemide kui  $\text{AgNO}_3$  süsteemide VF väljavoolus kontrollsüsteemiga võrreldes. Põhjus võib olla sama, mis *sulI* puhul: aeroobse keskkonna sobivus *tetA* geeni kandjatele. Samuti on ka *tetA* geenide puhul vesikeskkonnas täheldatud horisontaalset geeniülekannt, mis suurendab *tetA* geenide arvukust koosluses (Huang *et al.* 2015)

Uuritud katses vähenes ka *tetA* geeni arvukus HF väljavoolus 3-4 suurusjärku. Chen & Zhang (2013) uuritud olmereoveepuhastis vähenes *tetA* geeni arvukus 2-3 suurusjärku ning Makowska *et al.* (2016) uuritud olmereoveepuhastis kaks suurusjärku. Lisaks on Huang *et al.* (2015) uurinud vertikaalse ülesvoolu suunaga tehismärgala, kus seatööstuse reoveest määratud *tet*-geenide puhastusefektiivsus oli 45,4-99,9%

*BlaCTX-M* geeni leiti uuritud filtrite biokiles ARG-dest kõige vähem. Wen *et al.* (2016) on leidnud, et *blaCTX-M* geeni leidub ka aktiivmudapuhastis väga vähe (suurusjärgus  $10^2$

koopiat/ml). Samas täheldati nanoosakeste ja Ag-iooni erinevat mõju selle geeni arvukusele ja osakaalule HF-te filtermaterjali biokile bakterikoosluses. Arvukuse langus oli selle ARG puhul täheldatav peaaegu kõikide filtrite väljavooludes, mis võib tuleneda filtersüsteemi tingimuste ebasobivusest *blaCTX-M* geeni kandvatele organismidele. Ka *blaCTX-M* geeni arvukus vähenes uuritud süsteemis 3-4 suurusjärku. See on kooskõlas Laht *et al.* (2014) uuritud olmereoveepuhastis saadud tulemustega, kus on näidatud kuni 3 suurusjärku langust.

Vaadeldes erinevate ARG-de arvukuste ja osakaalude muutusi katseperioodi jooksul, võib järeldada, et hõbeda nanoosakestel on mikroobidele suurem mõju kui hõbenitraadil. Selline järeldus on kooskõlas teiste sarnaste hõbeiooni ning hõbeda nanoosakeste toksilisust käsitlevate uuringutega (Choi *et al.* 2008; Jeong *et al.* 2014; Yang *et al.* 2013; Yang *et al.* 2014).



## Kokkuvõte

Bioloogilistel protsessidel põhinev reoveepuhasti on suure bakterite arvukuse ning liigilise varieeruvusega keskkond, mistõttu leidub seal ka hulgaliselt ARG-e. Lisaks on reovees antibiootikumijääke, nanoosakesi ja muid mikroosaineid, mis võivad soodustada ARB-te seleksiooni. Kuna reoveepuhasti ühendab erinevaid keskkonnanähte nagu olmeveesi ja pinnavesi, on oht, et nii AB-d, ARG-d kui ARB-d võivad selliste süsteemide kaudu looduskeskkonda jõuda, kuna reoveepuhastis eemaldatakse neist vaid osa.

Käesolevas töös uurisid sünteetiliste hõbeda nanoosakeste ning hõbenitraadi mõju mikroobide üldarvukusele ning ARGide arvukusele Nõo tehismärgalapuhasti pinnasfiltrites ning võrreldi saadud tulemusi sama süsteemi reoveest mõõdetud geenandmetega. Uuringud teostati 2014 septembris ja oktoobris kogutud tehismärgalapuhasti vee- ja filtermaterjali proovidest, kust eraldati DNA ning määrati qPCR meetodil 16S rRNA geenikoopiate arvud ning *sull*, *tetA* ning *blaCTX-M* antibiootikumiresistentsusgeenide arvukused.

Antibiootikumiresistentsusgeenide kvantifitseerimisel saadud tulemused viitavad nanoosakeste ja AgNO<sub>3</sub> suhteliselt sarnasele mõjule nii *sull*, *tetA* kui *blaCTX-M* puhul. Kõigi ARG-de arvukus VF-is kas kasvas või ei muutunud ning langes HF-is (v.a *tetA* HF AgNO<sub>3</sub> süsteemis). ARG-de osakaalud kõigis filtrites langesid või ei muutunud (v.a *tetA* VF nanosüsteemis)

Peamised järeldused:

1. Ag nanoosakesed ning AgNO<sub>3</sub> ei mõjuta tehismärgalapuhasti puhastusefektiivsust märkimisväärselt.
2. Tehismärgalapuhasti on väiksem ARG-de allikas kui aktiivmudapuhasti.
3. Ag nanoosakesed vähendavad antibiootikumiresistentsusgeenide osakaalu pinnasfiltrite mikroobikoosluses rohkem kui AgNO<sub>3</sub> töötlus.
4. Hõbedaga ioonidega töötlus mõjutab antibiootikumiresistentsusgeenide arvukust ja osakaalu pinnasfiltrites ja reovees veidi erinevalt võrreldes hõbeda nanoosakestega.

Käesoleva töö tulemused kinnitavad kombineeritud tehismärgalapuhasti sobivust olmeveest nii looduslikku kui sünteetilist päritolu ARG-de ja madalas

kontsentratsioonis hõbeda nanoosakeste eemaldamiseks. Lisaks selgus, et hõbenitraat ja eriti hõbeda nanoosakesed vähendavad antibiootikumiresistentsusgeenide osakaalu olmereovee ja tehismärgalapuhasti mikroobikoosluses.

# **The effect of synthetic silver nanoparticles on abundance of bacteria and antibiotic resistance genes in the biofilm of hybrid constructed wetland**

Kadri Saare

## **Summary**

Despite the exponential growth of the concentrations of micropollutants as antibiotics and nanoparticles in municipal wastewater, sewage treatment plants and in the nature, their exact impact is largely unknown and the research is yet scarce.

Antibiotics have been used for decades in large quantities both in human and veterinary medicine, which has led to the accumulation of residues in the wastewater treatment plants and the environment. In addition to the effect on target organisms, the residues cause the selection of antibiotic resistant bacteria and affect natural bacterial communities.

The exponential growth of nanoproducts also increases the concentrations of nanoparticles in the environment. Synthetic silver nanoparticles are most widely used and therefore they are also found in sewage treatment plants, which leads these particles also to nature. The exact effects of synthetic nanoparticles are yet unclear, but the silver nanoparticles have potential to affect the wastewater treatment processes and therefore the environment.

The aim of this study was to investigate the impact of low concentration (0.1 mg/l) silver nanoparticles to the treatment efficiency, the abundance of bacteria and the abundance and proportion of antibiotic resistance genes in the Nõo hybrid constructed wetland. Investigated treatment system consisted of six mesocosms (6 vertical+6 horizontal subsurface flow filters), two of which were spiked with silver nanoparticles (0,1 mg/l), two were spiked with AgNO<sub>3</sub> (0,1 mg/l) and two were control systems.

The results of quantification of the antibiotic resistance genes indicated that the silver nanoparticles and AgNO<sub>3</sub> had a similar impact on *sul1*, *tetA* and *blaCTX-M* genes abundances in biofilm. All the abundances in the biofilm of the vertical subsurface system increased or remained unchanged (with few exceptions) and decreased in the horizontal subsurface system. The proportions of antibiotic resistance genes decreased or remained unchanged (with few exceptions). There were differences in the gene abundances between the treatments – the abundance was higher in the nanosystems on average but the proportion was higher in the

AgNO<sub>3</sub> system of the vertical subsurface flow filter and in the nanosystem of the horizontal flow filter.

The results also indicate that neither silver nanoparticles nor AgNO<sub>3</sub> affect system treatment efficiency significantly. In addition, the investigated treatment system releases less antibiotic resistance genes to environment compared to activated sludge treatment system. It was also revealed that silver nanoparticles and AgNO<sub>3</sub> affect the abundance of antibiotic resistance genes in biofilm differently. In addition it was found that silver nanoparticles reduce the proportion of antibiotic resistance genes in the biofilm of the subsurface flow filters more than AgNO<sub>3</sub> treatment.

## **Tänuavaldused**

Täna kõik, kes käesoleva töö valmimisel abiks olid, kuid kõige enam juhendaid Marika Truud ja Hiie Nõlvakut. Lisaks täna projekti meeskonda prof. Jaak Truud, dr. Teele Ligi, Kuno Kasakut, Kristjan Oopkaupi, Mikk Espenbergi ja Kertu Tiirikut ning Mae Uri TÜ geograafia osakonna biogeokeemia laborist ja dr. Kaja Kasemetsa KBFI –st.

Käesoleva magistritööga seotud kulutused on kaetud projekti „Ravimijäägid ja sünteetilised nanoosakesed reovees: mõju reoveepuhastusprotsessile ja ravimresistentsuse geenide levikule keskkonnas“ (3.2.0801.11-0026) ja IUT2-16 "Globaalne soojenemine ja maastike aineriing".

## Kasutatud kirjandus

1. Allen, H.K., Donato, J., Wang, H.H., Cloud-Hansen, K.A., Davies, J., Handelsman, J. (2010). Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. *Nat. Rev. Microbiol.* 8(4), 251-259.
2. Baun, A., Sørensen, S.N., Rasmussen, R.F., Hartmann, N.B., Koch, C.B. (2007). Toxicity and bioaccumulation of xenobiotic organic compounds in the presence of aqueous suspensions of aggregates of nano-C60. *Aquatic Toxicol.* 86(3), 379-387.
3. Berendonk, T.U., Manaia, C.M., Merlin, C., Fatta-Kassinos, D., Cytryn, E., Walsh, F., Bürgmann, H., Sørum, H., Norström, M., Pons, M.N. and Kreuzinger, N. (2015). Tackling antibiotic resistance: the environmental framework. *Nature Rev. Microbiol.*, 13(5), 310-317.
4. Blahna, M.T., Zalewski, C.A., Reuer, J., Kahlmeter, G., Foxman, B., Marrs, C.F. (2006). The role of horizontal gene transfer in the spread of trimethoprim–sulfamethoxazole resistance among uropathogenic *Escherichia coli* in Europe and Canada. *J. Antimicrob. Chemother.*, 57(4), 666-672.
5. Brar, S.K., Verma, M., Tyagi, R.D., Surampalli, R.Y. (2010). Engineered nanoparticles in wastewater and wastewater sludge – Evidence and impacts. *Waste manage.* 30(3), 504-520.
6. Brayne, R. (2008). The toxicological impact of nanoparticles. *Nano Today* 3(1), 48-55.
7. Brown, M.G., Balkwill, D.L. (2009). Antibiotic resistance in bacteria isolated from the deep terrestrial subsurface. *Microb. Ecol.* 57(3), 484-493.
8. Börjesson, S., Dienues, O., Jarnheimer, P.-Å., Olsen, B., Matussek, A., Lindgren, P.-E. (2009). Quantification of genes encoding resistance to aminoglycosides,  $\beta$ -lactams and tetracyclines in wastewater environments by real-time PCR. *Int. J. Environ. Heal. R.* 19(3), 219–230.
9. Caracciolo, A.B., Topp, E., Grenni, P. (2015). Pharmaceuticals in the environment: biodegradation and effects on natural microbial communities. A review. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 106, 25-36.

10. Chen, H. & Zhang, M. (2013). Occurrence and removal of antibiotic resistance genes in municipal wastewater and rural domestic sewage treatment systems in eastern China. *Environ. Int.* 55, 9-14.
11. Chen, J., Wei, X.-D., Liu, Y.-S., Ying, G.-G., Liu, S.-S., He, L.-X., Chen, F.-R., Yang, Y.-Q. (2016). Removal of antibiotics and antibiotic resistance genes from domestic sewage by constructed wetlands: Optimization of wetland substrates and hydraulic loading. *Sci. Total Environ.* 565, 240-248.
12. Chen, Y., Su, Y., Zheng, X., Chen, H., Yang, H. (2012). Alumina nanoparticles-induced effects on wastewater nitrogen and phosphorus removal after short-term and long-term exposure. *Water Res.* 46(14), 4379-4386.
13. Choi, O., Deng, K.K., Kim, N.-J., Ross Jr., L., Surampalli, R.Y. Hua, Z. (2008). The inhibitory effects of silver nanoparticles, silver ions, and silver chloride colloids on microbial growth. *Water Res.* 42(12), 3066-3074.
14. Christgen, B., Yang, Y., Ahamed, Z., Li, B., Rodriguez, D.C., Zhang, T., Graham, D.W. (2015). Metagenomics shows low energy anaerobic-aerobic treatment reactors reduce antibiotic resistance gene dissemination from domestic wastewater. *Environ. Sci. Technol.* 49(4), 2577-2584.
15. Colman, B.P., Espinasse, B., Richardson, C.J., Matson, C.W., Lowry, G.V., Hunt, D.E., Wiesner, M.R., Bernhardt, E.S. (2014). Emerging Contaminant or an Old Toxin in Disguise? Silver Nanoparticle Impacts on Ecosystems. *Environ. Sci. Technol.* 48(9), 5229-5236.
16. Colomer-Lluch, M., Jofre, J., Muniesa, M., 2011. Antibiotic resistance genes in the bacteriophage DNA fraction of environmental samples. *PLoS ONE* 6(3), e17549.
17. Cytryn, E. (2013). The soil resistome: The anthropogenic, the native, and the unknown. *Soil Biol. Biochem.* 63, 18-23.
18. De Souza, M.J., Nair, S., Bharathi, P.L., Chandramohan, D. (2006). Metal and antibiotic-resistance in psychrotrophic bacteria from Antarctic Marine waters. *Ecotoxicology* 15(4), 379-384.
19. Dethlefsen, L., Huse, S., Sogin, M.L., Relman, D.A. (2008). The Pervasive Effects of an Antibiotic on the Human Gut Microbiota, as Revealed by Deep 16S rRNA Sequencing. *PLoS Biology* 6(11), e280.

20. Farré, M., Gajda-Schrantz, K., Kantiani, L., Barceló, D. (2009). Ecotoxicity and analysis of nanomaterials in the aquatic environment. *Anal. Bioanal. Chem.* 393(1), 81-95.
21. Faulwetter, J.L., Gagnon, V., Sundberg, C., Chazarenc, F., Burra, M.D., Brisson, J., Camper, A.K., Stein, O.R. (2009). Microbial processes influencing performance of treatment wetlands: A review. *Ecol. Eng.* 35(6), 987-1004.
22. Fonder, N., Headley, T. (2013). The taxonomy of treatment wetlands: A proposed classification and nomenclature system. *Ecol. Eng.* 51, 203-211.
23. Heuer, H., Focks, A., Lamshöft, M., Smalla, K., Matthies, M., Spiteller, M., 2008. Fate of sulfadiazine administered to pigs and its quantitative effect on the dynamics of bacterial resistance genes in manure and manured soil. *Soil Biol. Biochem.* 40, 1892–1900.
24. Huang, X., Liu, C., Li, K., Su, J., Zhu, G., Liu, L. (2015). Performance of vertical up-flow constructed wetlands on swine wastewater containing tetracyclines and tet genes. *Water Res.* 70, 109-117.
25. Ivask, A., Juganson, K., Bondarenko, O., Mortimer, M., Aruoja, V., Kasemets, K., Blinova, I., Heinlaan, M., Slavyevkova, V., Kahru, A. (2014). Mechanisms of toxic action of Ag, ZnO and CuO nanoparticles to selected ecotoxicological test organisms and mammalian cells in vitro: A comparative review. *Nanotoxicology*, 8 (S1), 57-71.
26. Ivask, A., Kurvet, I., Kasemets, K., Blinova, I., Aruoja, V., Suppi, S., Vija, H., Kärkinen, A., Titma, T., Heinlaan, M., Visnapuu, M., Koller, D., Kisand, V., Kahru, A. (2014). Size-Dependent Toxicity of Silver Nanoparticles to Bacteria, Yeast, Algae, Crustaceans and Mammalian Cells In Vitro. *PLoS ONE* 21; 9(7), e102108.
27. Jechalke, S., Heuer, H., Siemens, J., Amelung, W., Smalla, K. (2014). Fate and effects of veterinary antibiotics in soil. *Trends Microbiol.* 22(9), 536-545.
28. Jeong, E., Im, W.T., Kim, D.H., Kim M.S., Kang, S., Shin, H.S., Chae, S.R. (2014). Different susceptibilities of bacterial community to silver nanoparticles in wastewater treatment systems. *J. Environ. Sci. Health. A Tox. Hazard. Subst. Environ. Eng.* 49(6), 685-693.
29. Kadlec, R.H., Wallace, S.D. (2009). *Treatment Wetlands*, Second edition. CRC Press, USA. 1016 lk.



30. Kaegi, R., Voegelin, A., Ort, C., Sinnet, B., Thalmann, B., Krismer, J., Hagendorfer, H., Elumelu, M., Mueller, E. (2013). Fate and transformation of silver nanoparticles in urban wastewater systems. *Water. Res.* 47(12), 3866-3877.
31. Kaisera, J.-P., Zuinb, S., Wicka, P. (2013). Is nanotechnology revolutionizing the paint and lacquer industry? A critical opinion. *Sci. Total Environ.* 442, 282-289.
32. Kasak, K., Mander, Ü., Truu, J., Truu, M., Järveoja, J., Maddison, M., Teemusk, A. (2015). Alternative filter material removes phosphorus and mitigates greenhouse gas emission in horizontal subsurface flow filters for wastewater treatment. *Ecol. Eng.* 77, 242-249.
33. Kemper, N. (2008). Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. *Ecol. Indic.* 8(1), 1-13.
34. Knapp, C.W., Dolfing, J., Ehlert, P. A., Graham, D.W. (2009). Evidence of increasing antibiotic resistance gene abundances in archived soils since 1940. *Environ. Sci. Technol.* 44(2), 580-587.
35. Kümmerer, K. (2009). Antibiotics in the aquatic environment – A review – Part I. *Chemosphere* 75, 417-434.
36. Kümmerer, K. (2009). Antibiotics in the aquatic environment – A review – Part II. *Chemosphere* 75, 435-441.
37. Laht, M., Karkman, A., Voolaid, V., Ritz, K., Tenson, T., Virta, M., Kisand, V. (2014). Abundances of Tetracycline, Sulphonamide and Beta-Lactam Antibiotic Resistance Genes in Conventional Wastewater Treatment Plants (WWTPs) with Different Waste Load. *PloS one*, 9(8), e103705.
38. Lam, C.W., James, J.T., McCluskey, R., Hunter, R.L. (2004). Pulmonary toxicity of single-wall carbon nanotubes in mice 7 and 90 days after intratracheal instillation. *Toxicol. Sci.* 77(1), 126-134.
39. Lee, C.-G., Fletcher, T.D., Sun, G. (2009). Nitrogen removal in constructed wetland systems. *Eng. Life Sci.*, 9(1), 11-22.
40. Li, Y., Zhu, G., Ng, W., Tan, S. (2014). A review on removing pharmaceutical contaminants from wastewater by constructed wetlands: Design, performance and mechanism. *Sci. Total. Environ.* 468, 908-932.

41. Liu, Z., Lozupone, C., Hamady, M., Bushman, F.D., Knight, R. (2007). Short pyrosequencing reads suffice for accurate microbial community analysis. *Nucleic Acids Res.* 35(18), e120.
42. Lu, S., Hu, H., Sun, Y., Yang, Y. (2009). Effect of carbon source on the denitrification in constructed wetlands. *J. Environ. Sci.* 21(8), 1036-1043.
43. Ma, R., Levard, C., Judy, J.D., Unrine, J.M., Durenkamp, M., Martin, B., Jefferson, B., Lowry, G.V. (2014). Fate of zinc oxide and silver nanoparticles in a pilot wastewater treatment plant and in processed biosolids. *Environ. Sci. Technol.* 48(1), 104-112.
44. Makowska, N., Koczura, R., Mokracka, J. (2016). Class 1 integrase, sulfonamide and tetracycline resistance genes in wastewater treatment plant and surface water. *Chemosphere*, 144, 1665-1673.
45. Mao, D., Yu, S., Rysz, M., Luo, Y., Yang, F., Li, F., Hou, J., Mu, Q., Alvarez, P. (2015). Prevalence and proliferation of antibiotic resistance genes in two municipal wastewater treatment plants. *Water Res.* 85, 458-466.
46. Martinez, J.L. (2009). Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. *Environ. Pollut.* 157(11), 2893-2902.
47. Meredith H.R., Srimani J.K., Lee A.J., Lopatkin A.J., You L. (2015). Collective antibiotic tolerance: mechanisms, dynamics and intervention. *Nat. Chem. Biol.* 11(3), 182-188.
48. Miteva, V.I., Sheridan, P.P., Brenchley, J.E. (2004). Phylogenetic and physiological diversity of microorganisms isolated from a deep Greenland glacier ice core. *Appl. Environ. Microbiol.* 70(1), 202-213.
49. Munir, M., Wong, K., Xagoraki, I. (2011). Release of antibiotic resistant bacteria and genes in the effluent and biosolids of five wastewater utilities in Michigan. *Water res.* 45(2), 681-693.
50. Murthy, S.K. (2007). Nanoparticles in modern medicine: State of the art and future challenges. *Int. J. Nanomedicine* 2(2), 129-141.
51. Musee, N., Thwalaa, M., Notaab, N. (2011). The antibacterial effects of engineered nanomaterials: implications for wastewater treatment plants. *J. Environ. Monit* 13(5), 1164-1183.

52. Nõlvak, H., Truu, M., Tiirik, K., Oopkaup, K., Sildvee, T., Kaasik, A., Mander, Ü., Truu, J. (2013). Dynamics of antibiotic resistance genes and their relationships with system treatment efficiency in a horizontal subsurface flow constructed wetland. *Sci. Total Environ.* 461, 636-644.
53. Paulson, J.A., Zaoutis, T.E., (2015). Nontherapeutic Use of Antimicrobial Agents in Animal Agriculture: Implications for Pediatrics. *Pediatrics* 114(3), 862-868.
54. Pedescoll, A., Corzo, A., Alvarez, E., García, J., Puigagut, J. (2011). The effect of primary treatment and flow regime on clogging development in horizontal subsurface flow constructed wetlands: An experimental evaluation. *Water. Res.* 45(12), 3579-3589.
55. Raj, S., Jose, S., Sumod, U.S., Sabitha, M. (2012). Nanotechnology in cosmetics: Opportunities and challenges. *J. Pharm. Bioallied Sci.* 4(3), 186-193.
56. Ruijter, J.M., Ramakers, C., Hoogaars, W.M.H., Karlen, Y., Bakker, O., van den Hoff, M.J.B., Moorman, A.F.M. (2009). Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Res.* 37(6), e45-e45.
57. Schaumann, G.E., Baumann, T., Lang, F., Vogel, H.-J., Schulz, R., Manz, W. (2015). Engineered nanoparticles in soils and waters (Eessõna). *Sci. Total Environ.* 535, 1-1.
58. Shang, L., Nienhaus, K., Nienhaus, G.U. (2014). Engineered nanoparticles interacting with cells: size matters. *J. Nanobiotechnology* 12(5), 1-26.
59. Sharma, V.K., Johnson, N., Cizmas, L., McDonald, T.J., Kim, H. (2016). A review of the influence of treatment strategies on antibiotic resistant bacteria and antibiotic resistance genes. *Chemosphere* 150, 702-714.
60. Sheng, Z., Liu, S. (2011). Effects of silver nanoparticles on wastewater biofilms. *Water Res.* 45(18), 6039-6050.
61. Summary of the latest data on antibiotic resistance in the European Union EARS-Net surveillance data November 2015 <http://ecdc.europa.eu/en/eaad/antibiotics-get-informed/antibiotics-resistance-consumption/Documents/antibiotics-resistance-EU-data-2015.pdf>
62. Zhang, C., Liang, Z., Hu, Z. (2014). Bacterial response to a continuous long-term exposure of silver nanoparticles at sub-ppm silver concentrations in a membrane bioreactor activated sludge system. *Water Res.* 50, 350-358.

63. Zhang, Y., Marrs, C.F., Simon, C., Xi, C. (2009). Wastewater treatment contributes to selective increase of antibiotic resistance among *Acinetobacter* spp. *Sci. Total Environ.* 407(12), 3702-3706.
64. Zheng, X., Wu, R., Chen Y. (2011). Effects of ZnO Nanoparticles on Wastewater Biological Nitrogen and Phosphorus Removal. *Environ. Sci. Technol.* 45(7), 2826-2832.
65. Tenover, F.C. (2006). Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *Am. J. of Medicine* 119(6) S3-S10.
66. Truu, M., Juhanson, J., Truu, J. (2009). Microbial biomass, activity and community composition in constructed wetlands. *Sci. Total Environ.* 407(13), 3958-3971.
67. Vale, G., Mehennaoui, K., Cambier, S., Libralato, G., Jomini, S., Domingos, R.F. (2016). Manufactured nanoparticles in the aquatic environment-biochemical responses on freshwater organisms: A critical overview. *Aquat. Toxicol.* 170, 162-174.
68. Van Boeckel, T.P., Brower, C., Gilbert, M., Grenfell, B.T., Levin, S.A., Robinson, T.P., Teillant, A., Laxminarayan, R. (2015). Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 112(18), 5649-5654.
69. Van Boeckel, T.P., Gandra, S., Ashok, A., Caudron, Q., Grenfell, B.T., Levin, S.A., Laxminarayan, R. (2014). Global antibiotic consumption 2000 to 2010: an analysis of national pharmaceutical sales data. *The Lancet Infect. Dis.*, 14(8), 742-750.
70. Vymazal, J. (2010). Constructed Wetlands for Wastewater Treatment. *Water* 2(3), 530-549
71. Vymazal, J. (2011). Constructed Wetlands for Wastewater Treatment: Five Decades of Experience. *Environ. Sci. Technol.* 2011, 45(1), 61-69.
72. Wen, Q., Yang, L., Duan, R., Chen, Z. (2016). Monitoring and evaluation of antibiotic resistance genes in four municipal wastewater treatment plants in Harbin, Northeast China. *Environ. Pollut.* 212, 34-40.
73. Yang, Y., Gajaraj, S., Wall, J.D., Hu, Z. (2013). A comparison of nanosilver and silver ion effects on bioreactor landfill operations and methanogenic population dynamics. *Water Res.* 47(10), 3422-3430.

74. Yang, Y., Quensen, J., Mathieu, J., Wang, Q., Wang, J., Li, M., Tiedje, J.M., Alvarez, P.J.J. (2014). Pyrosequencing reveals higher impact of silver nanoparticles than AgD on the microbial community structure of activated sludge. *Water Res.* 48 (317), e325.
75. Yang, Y., Wang, J., Xiu, Z., Alvarez, P.J.J. (2013). Impacts of silver nanoparticles on cellular and transcriptional activity of nitrogen-cycling bacteria. *Environ. Toxicol. Chem.* 32(7), 1488-1494.

## **Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks**

Mina, Kadri Saare (sünd. 03.01.1992)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

„Süntetiliste hõbeda nanoosakeste mõju kombineeritud tehismärgalapuhasti biokile bakterite ja antibiootikumiresistentsusgeenide arvukusele“

, mille juhendajad on Hiie Nõlvak ja Marika Truu

1.1. reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 18.05.2016